

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

Préparée au sein de l'école doctorale **SIBAGHE**
et de l'unité mixte de recherche **BGPI**

Spécialité : **Microbiologie-Parasitologie**

Présentée par **Imène MENSI**

**Localisation *in planta* de *Xanthomonas albilineans*
et identification de déterminants moléculaires
impliqués dans la colonisation épiphyte
de sa plante hôte, la canne à sucre.**

Soutenue le 18/11/2013 devant le jury composé de

Mme Alia DELLAGI, Maître de conférences, AgroParisTech, Paris	Rapporteur
M. Thierry HEULIN, Directeur de recherche, CNRS, Cadarache	Rapporteur
M. Philippe ROTT, Directeur de recherche, Cirad, Montpellier	Directeur de thèse
M. Michel NICOLE, Directeur de recherche, IRD, Montpellier	Président du jury

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

Préparée au sein de l'école doctorale **SIBAGHE**
et de l'unité mixte de recherche **BGPI**

Spécialité : **Microbiologie-Parasitologie**

Présentée par **Imène MENSI**

**Localisation *in planta* de *Xanthomonas albilineans*
et identification de déterminants moléculaires
impliqués dans la colonisation épiphyte
de sa plante hôte, la canne à sucre.**

Soutenue le 18/11/2013 devant le jury composé de

Mme Alia DELLAGI, Maître de conférences, AgroParisTech, Paris	Rapporteur
M. Thierry HEULIN, Directeur de recherche, CNRS, Cadarache	Rapporteur
M. Philippe ROTT, Directeur de recherche, Cirad, Montpellier	Directeur de thèse
M. Michel NICOLE, Directeur de recherche, IRD, Montpellier	Président du jury

*À Ma mère Samira
Mon père Habib
Mes deux frères
Mehdi et Bilel*

*Pour leur amour et soutien inestimables
Qu'ils trouvent ici l'expression de mon éternelle reconnaissance.*

Remerciements

C'est avec beaucoup de gratitude et d'émotion que je rédige ces dernières lignes pour remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail ainsi que ceux que j'ai rencontrés durant ces trois années de thèse. Les travaux qui font l'objet de cette thèse n'auraient pas été possibles sans l'aide et le soutien de ces personnes.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à Philippe Rott, directeur de l'UMR BGPI et mon directeur de thèse. Pour sa rigueur scientifique, son enthousiasme, sa disponibilité, son soutien et sa bonne humeur. Merci de m'avoir accueillie dans ton équipe, de m'avoir fait confiance et donné tous les moyens scientifiques et humains pour que je puisse mener à bien ce travail. Merci aussi pour ton encadrement et pour les différentes lectures de ce manuscrit. Travailler avec toi était un réel honneur tant au niveau professionnel que personnel.

Je tiens également à remercier Alia Dellagi et Thierry Heulin d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse. Je remercie aussi Michel Nicole d'avoir bien voulu faire partie de mon jury et d'avoir suivi mon travail de thèse.

Je remercie sincèrement les membres de mon comité de thèse : Marie-Agnès Jacques, Michel Nicole et Mathieu Arlat d'avoir suivi mon travail de thèse. Merci pour vos conseils, suggestions et encouragements. Un grand merci à Marie-Agnès Jacques pour sa relecture attentive et ses remarques constructives.

Je souhaite aussi remercier les membres de l'équipe 3 : Monique Royer, Stéphane Cociancich, Isabelle Pieretti, Julie Noel et Souhir Sabri pour leurs conseils, leur soutien et leur aide.

Je tiens également à remercier Philippe Roumagnac et Jean-Heinrich Daugrois pour la relecture du manuscrit et pour les discussions scientifiques.

J'exprime également mes remerciements à Daniel Gargani et Marie-Stéphanie Vernerey pour m'avoir initiée à la microscopie et pour avoir contribué à l'obtention des résultats. Merci également pour vos conseils et encouragements.

J'adresse aussi mes remerciements à Jean-Claude Girard pour ses connaissances prodiguées ainsi que pour les souches qu'il a collectées de par le monde.

Un grand merci à Marie-Josée Darroussat pour m'avoir initiée à la culture *in vitro*, pour sa précieuse aide au laboratoire, pour les différents services rendus et son soutien inconditionnel. Merci également pour les délicieux gâteaux.

Merci à tous ceux, qui d'une façon ou d'une autre, m'ont permis de passer cette thèse dans les meilleures conditions. Merci à Claire Neema pour sa compréhension et ses encouragements.

Merci à Florence et Dominique pour leur aide et leur disponibilité.

Je remercie aussi Damien Zaragoza pour son soutien technique en serre.

Je remercie aussi tous les membres de l'UMR BGPI pour les discussions scientifiques et sociales et leurs encouragements surtout pendant la rédaction de cette thèse : Daniel, Henry, Mathieu, Charlotte, Manu, Martine, Marie-Line, Romain, Julie, Corinne, Véronique...ainsi que les doctorants Thuy, Enrique, Guy, Pauline, Emilie, Anne et Souhir...Bon courage pour la suite !

Un clin d'œil particulier à Camila Gomez et Cyril Mango pour les bons moments passés ensemble.

Un grand merci à mes amis : Mona, Mathy, Sihem, Camila, Sébastien et Salwa. Merci de m'avoir soutenue et épaulée dans des moments difficiles.

Je remercie infiniment toute ma famille, mes chers parents, Samira et Habib, et mes deux frères Mehdi et Bilel sans qui je ne pourrais pas écrire ces remerciements aujourd'hui. Vous êtes ma force ! Vous m'avez toujours soutenue et avez toujours été présents pour moi. Merci d'avoir partagé mes joies et mes peines. Vous avez toujours respecté et encouragé mes choix. Merci pour votre amour, affection et sacrifices. MERCI POUR TOUT !

Mes remerciements s'adressent enfin à tous ceux que j'aurais pu oublier et qui m'ont soutenue et encouragée à un moment ou un autre.

Liste des abréviations

AHL : N-Acyl Homosérine Lactones
CBD : Cellulose Binding Domain
CFU: Colony Forming Unit
CUT : Carbohydrate Utilization with TBDT systems
DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns
DF : Diffusible Factor
DSF : Diffusible Signal Factor
EPS : Exopolysaccharides
HR : Hypersensitive Reaction
Hrp: Hypersensitive Response and Pathogenicity
LPS : Lipopolysaccharides
MAMP : Microbe-Associated Molecular Patterns
MLSA : Multi Locus Sequence Analysis
NRPS : Non-Ribosomal Peptide Synthetase
OmpA : Outer Membrane Proteins A
PCWDE : Plant Cell Wall Degrading Enzymes
PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PR : Pathogenesis-Related
PS : Polysaccharides de Surface
QS : Quorum-Sensing
ROS : Reactive Oxygen Species
rpf : Regulation of Pathogenicity Factors
SHD : Serine-Histidine-Asparagine
SPI-1: *Salmonella* Pathogenicity Island-1
SST2 : Système de Sécrétion de Type II
SST3: Système de Sécrétion de Type III
TBDT: TonB-Dependants Transporters
Tfp : Type IV Pili
UV : Ultraviolets
XLB : Fastidious Xylem-Limited Bacteria

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Représentation schématique des différents organes et tissus d'une plante que les bactéries phytopathogènes colonisent.	1
Figure 2. Bactéries associées à la surface foliaire d' <i>Arabidopsis thaliana</i> observées en microscopie électronique à balayage.	2
Figure 3. Principaux genres bactériens associés à la phyllosphère du riz, du trèfle, du soja et d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	2
Figure 4. Représentation schématique de l'anatomie d'une feuille.	3
Figure 5. Topographie de la surface foliaire du fraisier (Red Pearl) observée au microscope électronique.	3
Figure 6. Observations microscopiques de la surface foliaire de la tomate inoculée avec <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (75-3R) marquée à la GFP.	4
Figure 7. Schéma récapitulatif des principaux traits microbiens requis pour l'adaptation des bactéries épiphytes à la survie en surface de feuilles.	7
Figure 8. Représentation schématique des différentes hypothèses de la modification des propriétés de la phyllosphère par les bactéries épiphytes.	8
Figure 9. Représentation schématique simplifiée de la voie de transduction du signal chimio-tactique chez les bactéries.	10
Figure 10. Représentation schématique d'une coupe transversale d'une feuille montrant les principaux traits microbiens de la souche B728a de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> qui sont induits en surface des feuilles et ceux qui sont induits dans l'apoplaste.	10
Figure 11. Représentation du processus de formation d'un biofilm chez <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> .	11
Figure 12. Observation en microscopie électronique d'une feuille de haricot colonisée par <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> .	11
Figure 13. Rôle des adhésines fibrillaires (gène <i>fimA</i>) de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> dans la formation d'agrégats.	12
Figure 14. Représentation schématique du mode d'action de la syringoline A produite par <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> .	15
Figure 15. Localisation de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (A) et <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (B) au niveau des feuilles de riz.	17
Figure 16. Observation de microscopie électronique montrant la localisation de trois bactéries phytopathogènes.	17
Figure 17. Représentation schématique d'une cellule végétale.	18
Figure 18. Ponctuations ou « Pits » (flèches) présentes au niveau de la paroi du xylème de <i>Lindera megaphylla</i> .	21

Figure 19. Perception des agents pathogènes vasculaires et mécanismes de défense mis en place par les plantes.	22
Figure 20. Stratégies majeures utilisées par <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> et <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> pour coloniser leur plante hôte.	24
Figure 21. Représentation schématique des principaux facteurs de virulence des <i>Xanthomonas</i> spp.	25
Figure 22. Principaux facteurs de virulence des <i>Pectobacterium</i> spp.	25
Figure 23. Pili de type IV observés chez une souche sauvage de <i>Xylella fastidiosa</i> en microscopie électronique.	27
Figure 24. Illustration des interactions plante-agent pathogène.	32
Figure 25. Modèle illustrant l'interaction de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> avec des plantes hôtes sensibles et résistantes.	33
Figure 26. Perception du DSF et transduction du signal chez <i>X. campestris</i> .	34
Figure 27. Voies de régulation contrôlant l'expression des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .	35
Figure 28. Matrice énergétique du Brésil pour l'année 2010.	38
Figure 29. Caractéristiques morphologiques de la canne à sucre.	39
Figure 30. Caractéristiques anatomiques de la canne à sucre.	39
Figure 31. Carte géographique montrant l'aire de production de la canne à sucre et les zones affectées par l'échaudure des feuilles.	40
Figure 32. Symptômes d'échaudure des feuilles de la canne à sucre.	41
Figure 33. Symptômes atypiques d'échaudure des feuilles observés suite à une transmission aérienne de l'agent pathogène.	41
Figure 34. <i>Xanthomonas albilineans</i> . Aspect d'une cellule bactérienne et aspect de colonies bactériennes.	44
Figure 35. Cycle de vie de <i>Xanthomonas albilineans</i> .	45
Figure 36. Arbre phylogénétique construit sur la base des séquences partielles concaténées des gènes <i>dnaK</i> , <i>fyuA</i> , <i>gyrB</i> et <i>rpoD</i> de 119 souches de <i>Xanthomonas</i> .	46
Figure 37. Arbre phylogénétique construit sur la base des séquences concaténées de sept gènes de ménage (<i>gyrB</i> , <i>atpD</i> , <i>dnaK</i> , <i>efp</i> , <i>groEL</i> , <i>glnA</i> et <i>recA</i>) de neuf <i>Xanthomonadaceae</i> .	47
Figure 38. Présentation circulaire du chromosome de <i>X. albilineans</i> (souche GPE PC73).	49
Figure 39. Comparaison des 5 enzymes PCWDE codées par <i>X. albilineans</i> et par d'autres espèces de <i>Xanthomonadaceae</i> .	52
Figure 40. Représentation des 12 copies du cluster de gènes de 5 kb présent dans 12 loci du génome de la souche GPE PC73 de <i>X. albilineans</i> .	53
Figure 41. Organisation des gènes <i>rpf</i> chez <i>X. albilineans</i> et chez d'autres <i>Xanthomonadaceae</i> .	54

Figure 42. Comparaison du cluster des gènes LPS chez <i>X. albilineans</i> (souche GPE PC73), <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (souche B100) et <i>X. campestris</i> pv. <i>vasculorum</i> (souche NCPB702).	56
---	----

Chapitre 3

Partie 1

Figure 1. Growth of <i>Xanthomonas albilineans</i> XaFL07-1 in imprints of sugarcane leaves on selective medium two weeks after immersion of leaves in a bacterial suspension at 1×10^7 CFU/mL.	89
Figure 2. Formation of biofilm <i>in vitro</i> by wild-type strain XaFL07-1 and six polysaccharide mutants (M427, M448, M541, M903, M967, M1116) of <i>Xanthomonas albilineans</i> .	89
Figure 3. Growth of <i>Xanthomonas albilineans</i> XaFL07-1 (Wild type) and six polysaccharide mutants (M427, M448, M541, M903, M967, M1116) in modified Wilbrink's liquid medium (A) and in liquid minimal medium (B).	90
Figure 4. Cells of <i>Xanthomonas albilineans</i> observed by transmission electron microscopy (TEM). A: XaFL07-1 wild-type strain; B: Mutant M1116 (gene <i>rmd</i>) deficient in surface polysaccharide production.	91
Figure 5. Growth of <i>Xanthomonas albilineans</i> on selective medium after imprinting sugarcane leaves (upper and lower surfaces), two weeks after immersion of leaves in a bacterial suspension at 1×10^7 CFU/mL.	91
Figure 6. Formation of biofilm <i>in vitro</i> by <i>Xanthomonas albilineans</i> strain XaFL07-1 containing empty shuttle vector pUFR047 (A), quorum sensing mutant $\Delta rpfGCF$ M15 containing pUFR047 (B), and mutant $\Delta rpfGCF$ M15 complemented with plasmid pPR017Met (C).	92
Figure 7. Growth of <i>Xanthomonas albilineans</i> and quorum sensing mutant $\Delta rpfGCF$ M15 (with empty vector pUFR047 or complementing plasmid pUFR017Met) in modified Wilbrink's liquid medium (MW) and in liquid minimal medium (MM).	92

Partie 2

Figure 1. Leaf scald symptoms caused by strain XaFL07-1 of <i>Xanthomonas albilineans</i> after inoculation of sugarcane plants by the modified decapitation method.	118
Figure 2. Localization of <i>Xanthomonas albilineans</i> in tissues of sugarcane leaves: Confocal microscopic images (<i>a, b, c, d</i>) and transmission electron microscopy images (<i>e, f</i>) of cross sections of sugarcane leaves inoculated with water (<i>a</i>) or <i>Xanthomonas albilineans</i> (<i>b-f</i>).	119
Figure 3. Immunochemistry confirming localization of <i>Xanthomonas albilineans</i> in tissues of sugarcane leaves: Confocal microscope images of transverse sections of sugarcane leaf blades inoculated with (<i>a</i>) <i>X. albilineans</i> strain GPE PC73 and (<i>b</i>) water (taken at 30 dpi).	120
Figure 4. Localization of <i>Xanthomonas albilineans</i> in tissues of sugarcane stalks: Confocal microscopic images (<i>a, b, e</i>) and transmission electron microscopy images (<i>c, d, f</i>) of cross sections of sugarcane stalks inoculated with <i>Xanthomonas albilineans</i> .	121

Figure 5. Occurrence of <i>Xanthomonas albilineans</i> in storage tissues of sugarcane stalks: Confocal microscope images of cross-sections of sugarcane stalks inoculated with <i>Xanthomonas albilineans</i> .	122
Figure 6. Immunochemistry confirming localization of <i>Xanthomonas albilineans</i> in storage tissues of sugarcane stalks: Confocal microscope images of a transverse section of sugarcane stalks inoculated with <i>Xanthomonas albilineans</i> strain GPE PC73 (a-b) and water (c) (taken at 2 months post inoculation).	123
ESM Figure 1. Imprints of sugarcane internodes inoculated by <i>Xanthomonas albilineans</i> strain XaFL07-1: Growth of <i>Xanthomonas albilineans</i> strain XaFL07-1 after inoculation of selective medium by the stalk blot inoculation technique two months post inoculation.	124
ESM Figure 2. Localization of <i>Xanthomonas albilineans</i> in tissues of sugarcane leaves: Confocal microscopic images (a, b, c, d) and transmission electron microscopy images (e, f, g) of cross sections of sugarcane leaves inoculated with <i>Xanthomonas albilineans</i> .	125
ESM Figure 3. Localization of <i>Xanthomonas albilineans</i> in tissues of sugarcane stalks: Confocal microscopic images (a, b) and transmission electron microscopy images (c, d, e, f) of cross or longitudinal sections of sugarcane stalks inoculated with <i>Xanthomonas albilineans</i> .	126
ESM Figure 4. Occurrence of <i>Xanthomonas albilineans</i> in storage tissues of sugarcane stalks: Confocal microscope images of cross-sections of sugarcane stalks inoculated with <i>Xanthomonas albilineans</i> .	127

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1. Exemples de bactéries phytopathogènes qui colonisent les espaces intercellulaires du mésophylle foliaire (apoplaste).	17
Tableau 2. Concentration en mM de métabolites et d'ions présents dans l'apoplaste de trois espèces végétales : le maïs (<i>Zea mays</i>), le ricin (<i>Ricinus communis</i>) et l'orge (<i>Hordeum vulgare</i>).	18
Tableau 3. Exemples de bactéries phytopathogènes qui colonisent le xylème (bactéries vasculaires).	20
Tableau 4. Exemples de bactéries phytopathogènes intracellulaires du phloème (bactéries vasculaires).	20
Tableau 5. Concentration en mM de métabolites et d'ions présents dans l'apoplaste, dans le xylème et dans le phloème du maïs (<i>Zea mays</i>).	21
Tableau 6. Composés de la sève phloémienne potentiellement associés à la résistance des plantes ou à l'initiation des réactions de défense (signalisation).	22
Tableau 7. Phénotypes associés à la mutation de différents gènes <i>rpf</i> chez des bactéries DSF-dépendantes.	36
Tableau 8. Les 10 premiers pays producteurs de canne à sucre pour l'année 2011.	38
Tableau 9. Caractéristiques génomiques de certaines bactéries du genre <i>Xanthomonas</i> .	47
Tableau 10. Facteurs de pathogénie présents ou absents dans le génome de la souche GPE PC73 de <i>X. albilineans</i> .	48

Chapitre 2

Tableau 11. Mutants de <i>X. albilineans</i> utilisés au cours de notre étude.	63
Tableau 12. Souches sauvages de <i>X. albilineans</i> utilisées au cours de notre étude.	65

Chapitre 3

Partie 1

Table 1. Plasmids and bacterial strains used in this study.	93
Table 2. Survival on sugarcane leaves of six mutants of surface polysaccharides of <i>Xanthomonas albilineans</i> strain XaFL07-1.	95
Table 3. Survival on sugarcane leaves of one mutant of small NRPS molecules and four mutants of quorum sensing of <i>Xanthomonas albilineans</i> strain XaFL07-1.	95

Partie 2

Table 1. Characteristics of plasmids and bacterial strains used in this study.	116
---	-----

Table des matières

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	vi

Chapitre I : Introduction bibliographique 1

Partie 1 : ÉTAPES CLÉS DE LA COLONISATION D'UNE PLANTE PAR UNE BACTÉRIE PHYTOPATHOGENE ET FACTEURS DE PATHOGENIE IMPLIQUÉS 1

1 COLONISATION ÉPIPHYTE DE LA PLANTE HÔTE	2
1.1 Bactéries phytopathogènes associées à la phyllosphère	2
1.2 Écologie de la phyllosphère et interactions phyllosphère-bactéries	3
1.2.1 Topographie de la phyllosphère	3
1.2.2 Caractéristiques environnementales de la phyllosphère	4
1.2.2.1 Caractéristiques physiques de la phyllosphère	4
1.2.2.2 Disponibilité en nutriments et autres composés	5
1.3 Stratégies déployées par les bactéries pour coloniser la phyllosphère	7
1.3.1 Stratégies de tolérance : Production de composés bioactifs (résistance aux stress <i>versus</i> adaptation métabolique)	7
1.3.2 Stratégies d'évitement	9
1.3.2.1 Chimio-tactisme, mobilité et adhésion : Pré-requis pour la survie au niveau de la phyllosphère	9
1.3.2.1.1 Chimio-tactisme et mobilité	9
1.3.2.1.2 L'adhésion	11
1.3.2.2 La formation de biofilms: Une structure protectrice pour les bactéries épiphytes	13
1.3.2.3 Sécrétion d'effecteurs par le système de sécrétion de type III Hrp et de molécules bioactives	14
1.3.2.3.1 Sécrétion de molécules bioactives : Facteurs de transition d'un mode de vie épiphyte vers un mode de vie endophyte	14
1.3.2.3.2 Le Système de sécrétion de type III Hrp et ses effecteurs	15
2 COLONISATION ENDOPHYTE DE LA PLANTE HÔTE	16
2.1 Colonisation de l'apoplaste	17
2.1.1 Bactéries phytopathogènes associées à l'apoplaste : les bactéries non-vasculaires	17
2.1.2 L'apoplaste : caractéristiques et constituants	17
2.1.2.1 Caractéristiques et disponibilité en nutriments	17
2.1.2.2 Exemples de mécanismes de défense exprimés dans l'apoplaste	19
2.2 Colonisation des tissus vasculaires	20
2.2.1 Bactéries phytopathogènes associées aux tissus vasculaires : les bactéries vasculaires	20
2.2.2 Les faisceaux vasculaires : caractéristiques, disponibilité en nutriments et autres composés	21
2.2.2.1 Caractéristiques et constituants	21
2.2.2.2 Exemples de mécanismes de défense exprimés dans les tissus vasculaires	22
2.3 Stratégies déployées par les bactéries pour coloniser les tissus de la plante	23
2.3.1 Chimiotactisme et mobilité : mécanismes préliminaires à la colonisation de la plante hôte	25
2.3.2 L'adhésion	27
2.3.3 La production d'exopolysaccharides	28
2.3.4 La production de phytotoxines	29

2.3.5	La dégradation de la paroi végétale.....	30
2.3.6	Le SST3 Hrp et ses effecteurs.....	32
2.3.7	Le quorum-sensing : régulation de l'expression des gènes de virulence.....	34
2.3.8	Autres stratégies.....	36

PARTIE 2: LE PATHOSYSTÈME CANNE À SUCRE - *XANTHOMONAS ALBILINEANS* **37**

1	LA PLANTE HÔTE : LA CANNE À SUCRE	37
1.1	Biologie, taxonomie et génétique	37
1.2	Répartition géographique et importance économique	38
1.3	Description morphologique et anatomique.....	38
1.4	Principales maladies de la canne à sucre	39
2	LA MALADIE : L'ÉCHAUDURE DES FEUILLES DE LA CANNE À SUCRE	40
2.1	Répartition géographique et importance économique	40
2.2	Symptômes de la maladie	40
2.3	Mode de transmission de la maladie.....	42
2.4	Méthodes de lutte	42
3	L'AGENT CAUSAL : <i>XANTHOMONAS ALBILINEANS</i>.....	43
3.1	Classification, morphologie et physiologie	43
3.2	Cycle infectieux.....	44
3.3	<i>Xanthomonas albilineans</i> : une bactérie particulière et originale au sein du genre <i>Xanthomonas</i>	46
3.3.1	Position phylogénétique particulière.....	46
3.3.2	Caractéristiques du génome de <i>X. albilineans</i>	47
3.3.2.1	Un génome réduit	47
3.3.2.2	Une artillerie réduite.....	48
3.3.2.3	Des séquences codantes particulières.....	49
3.3.2.3.1	Le système de sécrétion de type III de la famille SPI-1	49
3.3.2.3.2	Les mégaenzymes NRPS "Non-Ribosomal Peptide Synthetases"	50
a)	L'albicidine : une phytotoxine unique et spécifique à <i>X. albilineans</i>	50
b)	Les autres petites molécules produites par les NRPS	51
3.3.2.3.3	Les enzymes de dégradation de la paroi végétale	52
3.3.2.3.4	Un cluster de 5 kb présent dans douze loci différents	53
3.4	Facteurs de pathogénie chez <i>X. albilineans</i>	53
3.4.1	Facteurs de pathogénie identifiés par génomique fonctionnelle.....	53
3.4.1.1	Les gènes du quorum-sensing	54
3.4.1.2	Les polysaccharides de surface.....	55
3.4.1.3	Les protéines de la membrane externe.....	57
3.4.2	Facteurs putatifs de pathogénie identifiés par hybridation soustractive et suppressive.....	58
3.5	Variabilité du pouvoir pathogène et diversité génétique de <i>X. albilineans</i>	59

Chapitre II : Objectifs de la thèse..... 61

Chapitre III : Résultats..... 66

Partie 1 : DÉTERMINANTS MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA SURVIE ÉPIPHYTE DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS* **66**

Article 1: Surface polysaccharides and quorum-sensing are involved in survival of *Xanthomonas albilineans* on sugarcane leaves **68**

Partie 2 : REDÉFINITION DE LA LOCALISATION DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS* DANS LES TISSUS DE LA CANNE À SUCRE 96

Article 2: Breaking dogmas: The plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome 98

Chapitre IV : Discussion et perspectives..... 128

I/ SURVIE ÉPIPHYTE DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS* ET DÉTERMINANTS MOLÉCULAIRES ASSOCIÉS 128

II/ REDÉFINITION DE LA LOCALISATION DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS* DANS LES TISSUS DE LA CANNE À SUCRE 138

Chapitre V : Conclusion générale..... 145

Références bibliographiques 148

Annexes..... 172

Résultats complémentaires 172

Annexe 1 : Fleites L, Mensi I, Gargani D, Zhang S, Rott P, Gabriel DW, 2013. *Xanthomonas albilineans* OmpA1 appears to be functionally modular and both the OMC and C-like domains are necessary for leaf scald disease of sugarcane. *MPMI*, 26 (10): 1200–1210. 172

Annexe 2 : Mensi I, Girard J-C, Pieretti I, Larbre F, Roumagnac P, Royer M, Rott P, 2013. First Report of Sugarcane Leaf Scald in Gabon Caused by a Highly Virulent and Aggressive Strain of *Xanthomonas albilineans*. *Plant Disease*, 97(7):988. 173

Annexe 3 : Rott P, Fleites LA, Mensi I, Sheppard L, Daugrois JH, Dow M, Gabriel DW, 2013. The RpfCG two-component system negatively regulates the colonization of sugarcane stalks by *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology*, 159:1149-1159. 177

Annexe 4: Extent of epiphytic survival of wild-type strains XaFL07-1, GPE PC73 of *Xanthomonas albilineans* and the strain XaS3. 178

Introduction bibliographique

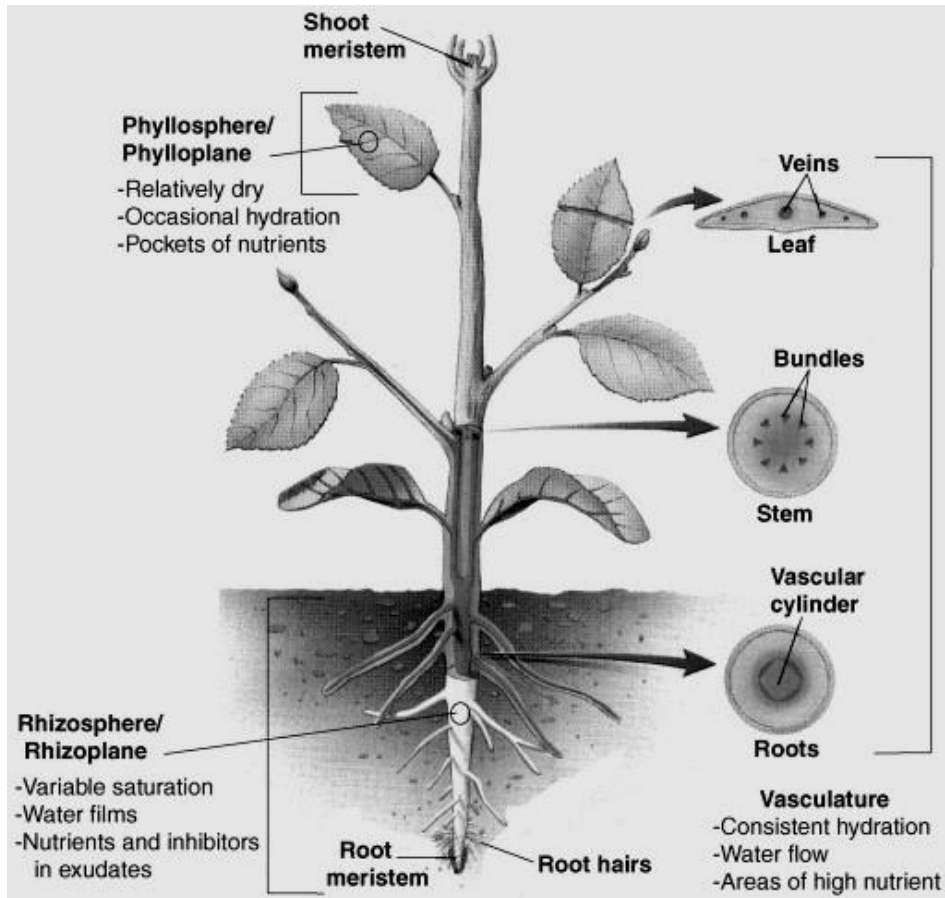


Figure 1. Représentation schématique des différents organes et tissus d'une plante que les bactéries phytopathogènes colonisent (Ramey *et al.*, 2004). Les bactéries phytopathogènes se multiplient en surface des racines (rhizoplan), des parties aériennes de la plante, notamment sur les feuilles (phylloplan), ainsi qu'à l'intérieur des organes de la plante (système vasculaire et apoplaste).

Chapitre I : Introduction bibliographique

Partie 1 : ÉTAPES CLÉS DE LA COLONISATION D'UNE PLANTE PAR UNE BACTÉRIE PHYTOPATHOGÈNE ET FACTEURS DE PATHOGÉNIE IMPLIQUÉS

Les microorganismes et notamment les bactéries sont capables de survivre et de se multiplier en surface des tissus aériens, des racines et des graines, ainsi qu'à l'intérieur des différents organes de la plante (Figure 1). Chaque organe ou tissu envahi présente des caractéristiques physico-chimiques qui lui sont propres et cette situation présente des challenges ou des opportunités pour les microorganismes qui y sont associés. Pour provoquer une maladie, comme c'est le cas pour les bactéries pathogènes des mammifères, les bactéries pathogènes de plantes doivent être capables (i) d'adhérer aux surfaces de leur hôte, (ii) de coloniser et d'envahir les tissus de celui-ci, (iii) de se multiplier et de moduler l'environnement de leur hôte, (iv) de contourner ou d'échapper aux systèmes de défense de ce dernier, (v) de survivre entre deux cycles infectieux, et finalement (vi) de se transmettre ou d'être transmises à d'autres plantes hôtes. En conséquence, les bactéries phytopathogènes déploient des stratégies multiples et variées pour contourner les mécanismes de défense de leurs plantes hôtes, ce qui leur permet de coloniser ces dernières et d'en tirer profit. Ces stratégies reposent essentiellement sur des caractéristiques génomiques qui sont propres à chaque espèce bactérienne et qui peuvent varier en fonction du mode de vie ou du mode de nutrition de ces microorganismes.

Qu'elles soient nécrotrophes (nécrogènes), comme *Pectobacterium atrosepticum*, ou hémibiotrophes (macérogènes) comme *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, le cycle infectieux de la majorité des bactéries phytopathogènes comprend en général deux étapes essentielles (Rico *et al.*, 2009) : (i) une première étape de survie en surface des tissus aériens ou rhizosphériques, pendant laquelle les bactéries se développent en tant qu'épiphytes et adhèrent aux surfaces sans provoquer de symptômes; (ii) une deuxième étape pendant laquelle les bactéries sont de vrais parasites : elles pénètrent à l'intérieur des tissus de la plante et elles sont alors appelées bactéries endophytes ; elles se multiplient et envahissent les tissus, et cette situation résulte habituellement en l'apparition de symptômes. Dans cette partie du manuscrit, deux étapes clés, à savoir la colonisation de la surface foliaire (encore appelée phylloplan) et la colonisation des tissus internes de la plante hôte par une bactérie phytopathogène, sont présentées. Les stratégies développées par les bactéries phytopathogènes pour coloniser différents niches seront également exposées.



Figure 2. Bactéries associées à la surface foliaire d'*Arabidopsis thaliana* observées en microscopie électronique à balayage (http://microbewiki.kenyon.edu/images/8/82/Phyllosphere_b_gross.png).

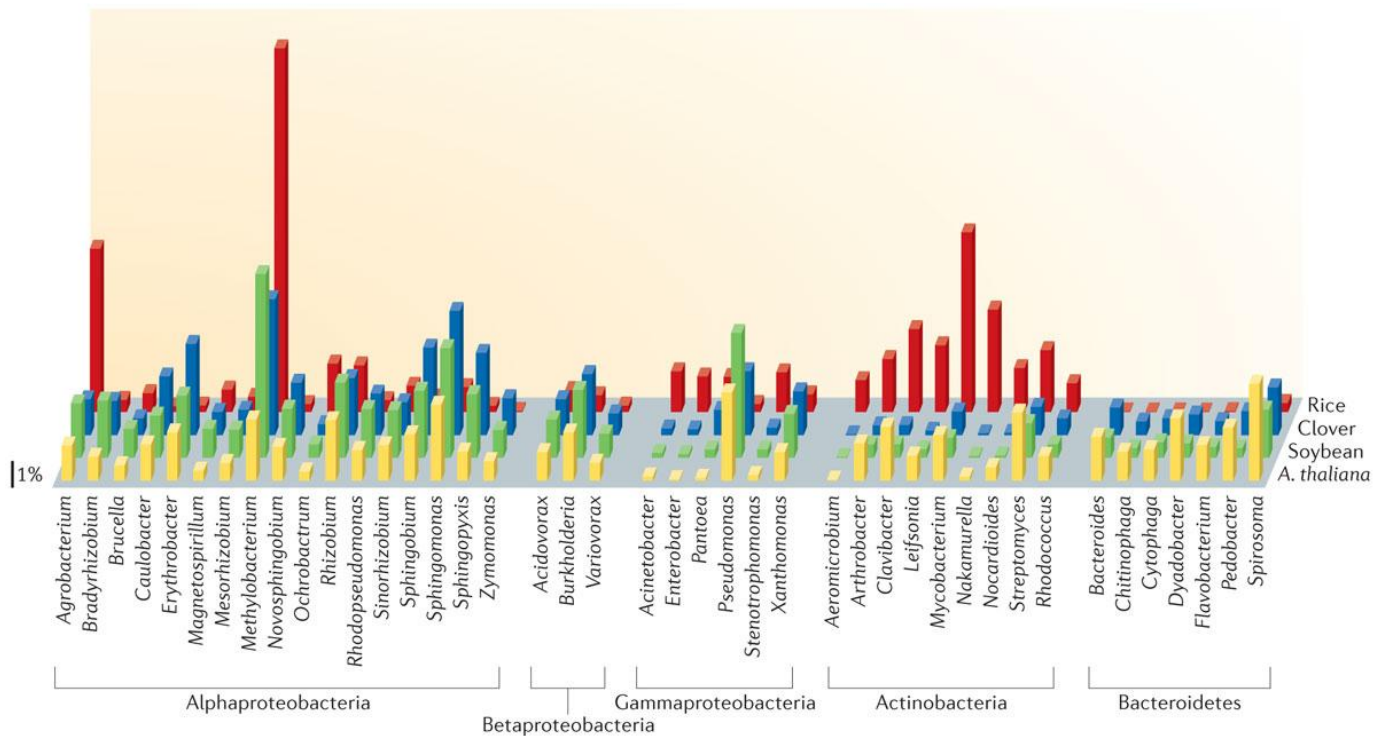


Figure 3. Principaux genres bactériens associés à la phyllosphère du riz, du trèfle, du soja et d'*Arabidopsis thaliana* (Vorholt, 2012).

1 COLONISATION ÉPIPHYTE DE LA PLANTE HÔTE

La phyllosphère comprend les parties aériennes de la plante. Elle est constituée essentiellement par les feuilles, mais également par l'environnement qui lui est soumis (Hirano et Upper, 2000). Les microorganismes qui sont capables de survivre et de se multiplier au niveau de la phyllosphère sont appelés épiphytes (Lindow et Brandl, 2003). La surface foliaire constitue un habitat très vaste pour les microorganismes. En effet, la surface foliaire globale des végétaux terrestres a été estimée à $508 \times 10^6 \text{ km}^2$ (Woodward et Lomas, 2004). Les bactéries épiphytes (Figure 2) sont les microorganismes les plus abondants au niveau de la phyllosphère (environ 10^6 à 10^7 cellules/cm²) (Lindow et Brandl, 2003). La structure et la diversité des communautés bactériennes associées à la phyllosphère ont fait l'objet de nombreux travaux (Delmotte *et al.*, 2009 ; Rastogi *et al.*, 2012 ; Redford *et al.*, 2010 ; Vorholt, 2012). Ces communautés bactériennes sont riches en diversité, mais cette diversité est cependant relativement faible en comparaison de celle que l'on peut observer pour les communautés bactériennes associées à la rhizosphère (Delmotte *et al.*, 2009 ; Knief *et al.*, 2012). Par ailleurs, les bactéries appartenant à la division des protéobactéries et plus particulièrement les α - et les γ -protéobactéries prédominent dans la phyllosphère de différentes espèces végétales (Rastogi *et al.*, 2012 ; Redford *et al.*, 2010 ; Whipps *et al.*, 2008). Plusieurs genres bactériens comprenant des espèces phytopathogènes (*Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Leifsonia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* et *Xanthomonas*) sont récurrents au niveau de la surface foliaire de diverses plantes (Figure 3), où ils mènent une vie épiphyte avant d'initier l'infection (Rastogi *et al.*, 2012 ; Vorholt, 2012). Ces bactéries épiphytes doivent s'adapter à une niche écologique qui représente un habitat particulièrement hostile étant donné l'altération importante, rapide et fréquente des conditions environnementales à la surface des feuilles (Hirano et Upper, 2000).

1.1 Bactéries phytopathogènes associées à la phyllosphère

De nombreuses espèces bactériennes peuvent cohabiter au niveau de la phyllosphère (Figure 3). Les bactéries phytopathogènes connues pour avoir une phase de développement épiphyte durant leur cycle infectieux appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Erwinia*. Celles-ci se multiplient au niveau de la phyllosphère et pénètrent dans les tissus foliaires pour initier la maladie lorsque les conditions sont favorables. La souche B728a de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (agent causal de la tache bactérienne du haricot) est l'un

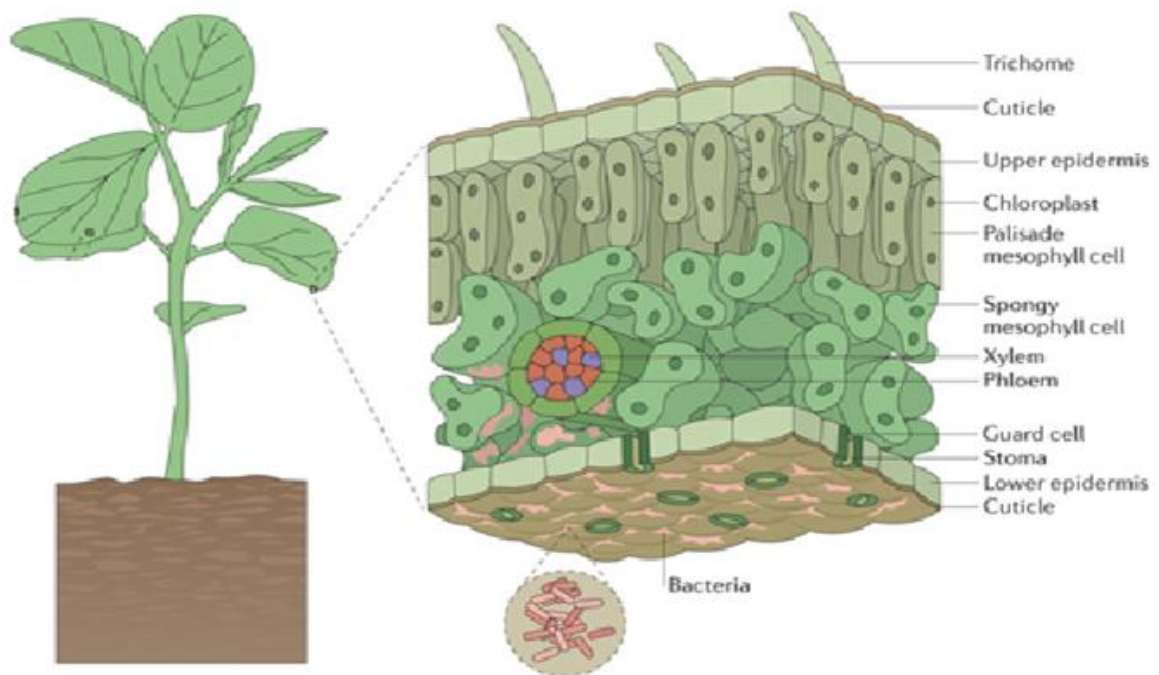


Figure 4. Représentation schématique de l'anatomie d'une feuille (Vorholt, 2012). Plusieurs microorganismes et notamment les bactéries colonisent la surface foliaire et l'apoplaste.

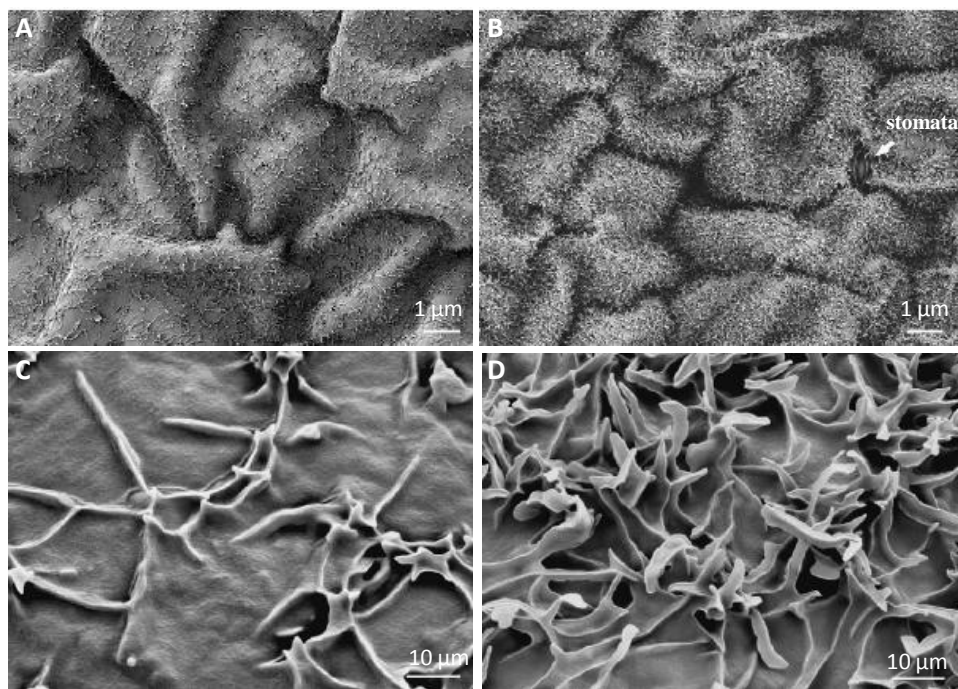


Figure 5. Topographie de la surface foliaire du fraisier (Red Pearl) observée au microscope électronique (Kim *et al.*, 2009b). Face supérieure (A) et face inférieure (B). Grossissement montrant les cristaux de cires épicuticulaires au niveau de la face supérieure (C) et de la face inférieure (D).

des agents pathogènes foliaires ayant une phase épiphyte prononcée en surface des feuilles. Cette espèce bactérienne est d'ailleurs considérée comme un modèle pour étudier la survie épiphyte des agents phytopathogènes foliaires (Hirano et Upper, 2000 ; Wilson *et al.*, 1999 ; Yu *et al.*, 2013). L'installation des bactéries phytopathogènes foliaires au niveau de la phyllosphère constitue une étape cruciale pour la réussite de l'infection (Hirano et Upper, 2000 ; Stromberg *et al.*, 1999 ; Wilson *et al.*, 1999). Ainsi, la taille des populations bactériennes en surface des feuilles détermine le développement ou non de la maladie, et offre une source d'inoculum pour le cycle infectieux suivant (Akhavan *et al.*, 2013). La présence de populations bactériennes au niveau de la phyllosphère contribue également à la recrudescence des maladies (Beattie et Lindow, 1995 ; Daugrois *et al.*, 2003 ; Hirano et Upper, 2000).

1.2 Écologie de la phyllosphère et interactions phyllosphère-bactéries

1.2.1 Topographie de la phyllosphère

D'un point de vue anatomique, trois tissus majeurs constituent les feuilles : la cuticule et l'épiderme, le mésophylle ou parenchyme foliaire, et le système vasculaire (Figure 4). Le premier contact entre les bactéries immigrantes et la surface foliaire a lieu au niveau de la cuticule. Celle-ci étant composée de deux polymères hydrophobes, la cutine (polymère de polyester intimement lié à l'épiderme) et la cire épicuticulaire, la cuticule forme ainsi une barrière lipophile caractérisée par une perméabilité très faible pour les substances polaires (Schonherr, 2006). Elle limite par conséquent la diffusion passive des nutriments et de l'eau de l'intérieur vers la surface foliaire et définit ainsi l'hydrophobicité de la feuille (Müller et Riederer, 2005 ; Yephremov et Schreiber, 2005). Les cires épicuticulaires, qui forment la couche la plus externe de la cuticule et qui sont en contact direct avec l'environnement, peuvent avoir des structures cristallines tridimensionnelles très variables selon l'espèce végétale et l'âge des feuilles (Figure 5) (Ensikat *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2009b). La cuticule présente également à sa surface des stomates, des hydathodes, des trichomes et des glandes, ainsi que des crevasses au niveau des nervures. Ces structures présentes en surface de la feuille et leur nature cireuse font qu'à l'échelle d'une bactérie, la topographie de la surface foliaire peut être comparable à un relief comportant des pics, des vallées et des cavités (Figure 5) (Hirano et Upper, 2000 ; Lindow et Brandl, 2003).

Les propriétés physico-chimiques de la cuticule influencent la transpiration et les échanges gazeux. Les cuticules les plus épaisses interfèrent avec la survie des bactéries

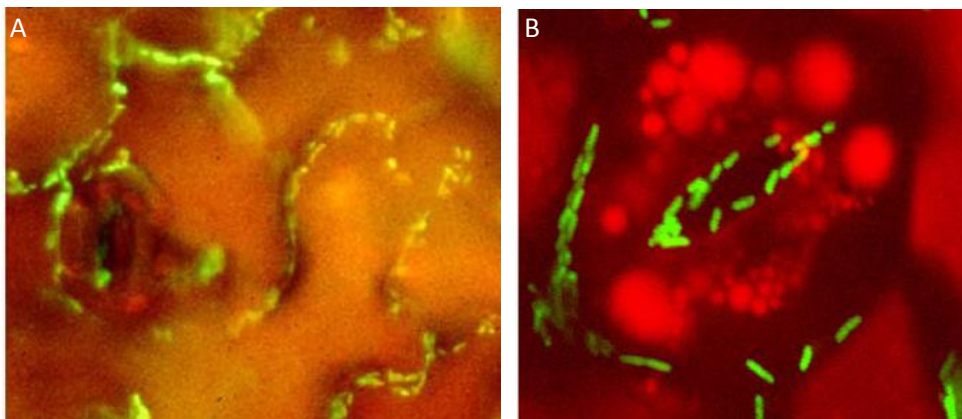


Figure 6. Observations microscopiques de la surface foliaire de la tomate inoculée avec *Xanthomonas euvesicatoria* (75-3R) marquée à la GFP (Zhang *et al.*, 2009). Les bactéries fluorescentes colonisent les crevasses formées entre les cellules épidermiques (A), les dépressions autour des stomates, ainsi que l'ostiole (A et B).

épiphytes en limitant la diffusion des nutriments et les échanges gazeux (Hirano et Upper, 2000 ; Lindow et Brandl, 2003 ; Müller et Riederer, 2005). Une fois installées à la surface foliaire, les bactéries forment de larges agrégats (ou biofilms) et colonisent préférentiellement des sites ou des niches protégés. Les sites les plus fréquemment colonisés par les bactéries sont situés au niveau des dépressions le long des nervures, à la base des trichomes, au niveau des stomates et des hydathodes (Figure 6) (Mariano et McCarter, 1993 ; Monier et Lindow, 2004 ; Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2009). Les bactéries sont également rencontrées dans des sites spécifiques présents chez certaines plantes comme les sillons des stomates du laurier ou les poils pectiques au niveau des feuilles de l'olivier (Surico, 1993). En général, les bactéries sont plus abondantes au niveau de la face inférieure des feuilles, ce qui est vraisemblablement dû au fait que cette dernière possède un nombre plus important de trichomes et de stomates que la face supérieure, qu'elle a une cuticule plus fine et qu'elle est moins exposée aux rayonnements ultraviolets (UV) (Beattie et Lindow, 1999 ; Surico, 1993 ; Whipps *et al.*, 2008). Par ailleurs, la taille des populations bactériennes est proportionnelle à la densité des trichomes (Yadav *et al.*, 2005).

1.2.2 Caractéristiques environnementales de la phyllosphère

1.2.2.1 Caractéristiques physiques de la phyllosphère

Les bactéries épiphytes, exposées à la surface des feuilles, sont sujettes à des fluctuations rapides et extrêmes de température, de rayonnements UV, de vent et d'humidité relative (Beattie et Lindow, 1995 ; Hirano et Upper, 2000 ; Lindow et Brandl, 2003). Ces fluctuations qui peuvent se produire fréquemment et rapidement chaque jour (à savoir en quelques secondes à quelques heures) font de la phyllosphère un environnement hostile par comparaison avec d'autres environnements extrêmes mais stables (Hirano et Upper, 2000 ; Lindow et Brandl, 2003; Montesinos *et al.*, 2002). Les paramètres environnementaux de la phyllosphère peuvent affecter considérablement l'installation des microorganismes en surface des feuilles, notamment les bactéries. Un des facteurs limitant la colonisation de la phyllosphère par les bactéries épiphytes est le flux de rayonnements UV. Il a été démontré que les bactéries sont plutôt sensibles aux UVB (290-320 nm) qui provoquent l'endommagement de l'ADN bactérien (Gunasekera et Paul, 2007 ; Jacobs *et al.*, 2005 ; Kadivar et Stapleton, 2003). En général, les populations bactériennes épiphytes augmentent lorsque le climat est humide (humidité relative élevée et après les chutes de pluies). A titre d'exemple, les populations de cellules solitaires de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* augmentent en

surface des feuilles de haricot après un événement pluvieux (Jacques *et al.*, 2005). Cependant, les pluies intenses peuvent aussi réduire considérablement les populations bactériennes présentes en surface des feuilles. Ainsi, suite à un épisode pluvieux, une population bactérienne de 10^5 CFU par feuille de haricot peut être rapidement lessivée (Hirano et Upper, 2000). D'autres facteurs comme l'humidité relative subissent également des variations journalières importantes, ce qui peut indirectement affecter la survie des bactéries épiphytes. En effet, la variation du niveau d'humidité relative pendant le cycle jour/nuit conduit à une variabilité de la disponibilité en nutriments et en eau, mais aussi de l'osmolarité au niveau de la feuille (Hirano et Upper, 2000). Étant donné qu'elle peut altérer les caractéristiques physiques de la phyllosphère, la disponibilité temporelle et spatiale de l'eau est aussi un facteur important pour la survie épiphyte des bactéries (Beattie, 2011). En effet, la dessiccation induit une augmentation de la concentration des solutés et des composés antimicrobiens émis par la plante au niveau de la surface foliaire. Une telle augmentation peut altérer la totalité de la population épiphyte (Beattie et Lindow, 1995). Ainsi, les agrégats bactériens formés par *P. syringae* pv. *syringae* ont des tailles plus importantes sur les feuilles de haricot humides que sur les feuilles sèches (Dulla et Lindow, 2008).

1.2.2.2 Disponibilité en nutriments et autres composés

La survie épiphyte des bactéries dépend de la disponibilité en nutriments carbonés, principalement, et en composés azotés, secondairement. En effet, la taille des populations bactériennes épiphytes est positivement corrélée avec l'abondance de composés carbonés (Mercier et Lindow, 2000 ; Wilson et Lindow, 1994). Une large variété de composés organiques et inorganiques comme les sucres, les acides aminés et les acides organiques est relarguée passivement par les plantes au niveau de la surface des feuilles. Cependant, leur composition et leur abondance varient en fonction de l'espèce végétale et des caractéristiques physico-chimiques de la cuticule. Le glucose, le fructose et le saccharose sont les sources de carbone les plus abondantes en surface de la feuille. Cependant, ces sucres ne sont pas facilement accessibles aux bactéries épiphytes car la distribution de ces nutriments au niveau de la surface foliaire est spatialement très hétérogène (Mercier et Lindow, 2000 ; Miller *et al.*, 2001 ; Remus-Emsermann *et al.*, 2011 ; van der Wal et Leveau, 2011). En effet, en exprimant une protéine fluorescente fusionnée à un promoteur de fructose dans les cellules d'*Erwinia herbicola*, on s'aperçoit que la majorité des bactéries consomment du fructose et sont aléatoirement distribuées en surface des feuilles une heure après inoculation. Cependant, 24

heures après inoculation, le nombre de bactéries consommant le fructose diminue à 1% voire moins (Leveau et Lindow, 2001a et b). Les cellules bactériennes qui continuent à consommer le fructose ne sont pas dispersées aléatoirement en surface des feuilles, mais sont plutôt localisées dans des sites particuliers comme le long des nervures et près des stomates. Ces résultats indiquent que les nutriments sont abondants uniquement dans très peu de sites de la surface foliaire. Par conséquent, la plupart des bactéries immigrantes vont faire face à un environnement oligotrophe, et seulement un faible nombre de bactéries va pouvoir accéder à des sites riches en éléments nutritifs (Lindow et Brandl, 2003 ; Remus-Emsermann *et al.*, 2011).

Mises à part les contraintes nutritionnelles, les bactéries épiphytes sont aussi sujettes à l'effet des composés antimicrobiens sécrétés au niveau de la surface foliaire, tels que les métabolites secondaires (terpènes, acides phénoliques) et les protéines de défense (Karamonali *et al.*, 2005 ; Shepherd et Wagner, 2007). Ces molécules, présentes au niveau de l'apoplaste, sont sécrétées en général par des structures spécialisées telles que les hydathodes, les stomates et les trichomes glandulaires puis réparties sur toute la surface foliaire. Les métabolites secondaires présents au niveau de la phyllosphère constituent une barrière chimique contre les invasions bactériennes. En effet, certaines espèces végétales (l'origan par exemple) dont les métabolites secondaires ont une forte activité antimicrobienne s'avèrent faiblement colonisées par les bactéries épiphytes (Karamonali *et al.*, 2005). De plus, la densité des bactéries épiphytes est inversement proportionnelle à la concentration d'un glucosinolate présent à la surface foliaire de certaines plantes potagères (Ruppel *et al.*, 2008). Les protéines de défense PR (pour **p**athogenesis-**r**elated) notamment les défensines, les chitinases, les glucanases et les lipases sont retrouvées au niveau de la phyllosphère (Grunwald *et al.*, 2003 ; Shepherd et Wagner, 2007). Ces protéines antimicrobiennes inhibent vraisemblablement la pénétration des bactéries mobiles *via* les hydathodes (Grunwald *et al.*, 2003). D'autre part, les plantes émettent aussi des quantités importantes de composés organiques volatiles tels que les alcanes, les alcènes, les alcools, les éthers, les esters et les acides carboxyliques. Ces composés jouent un rôle dans l'attraction et la répulsion des microorganismes et peuvent avoir un effet toxique sur ces derniers (Peñuelas et Llusà, 2004).

Etant données les contraintes rencontrées au niveau de la phyllosphère, une question s'impose : quelles sont les stratégies déployées par les bactéries phytopathogènes pour survivre dans cet environnement hostile et qui leur permettent d'affronter ces différents types de stress environnementaux ?

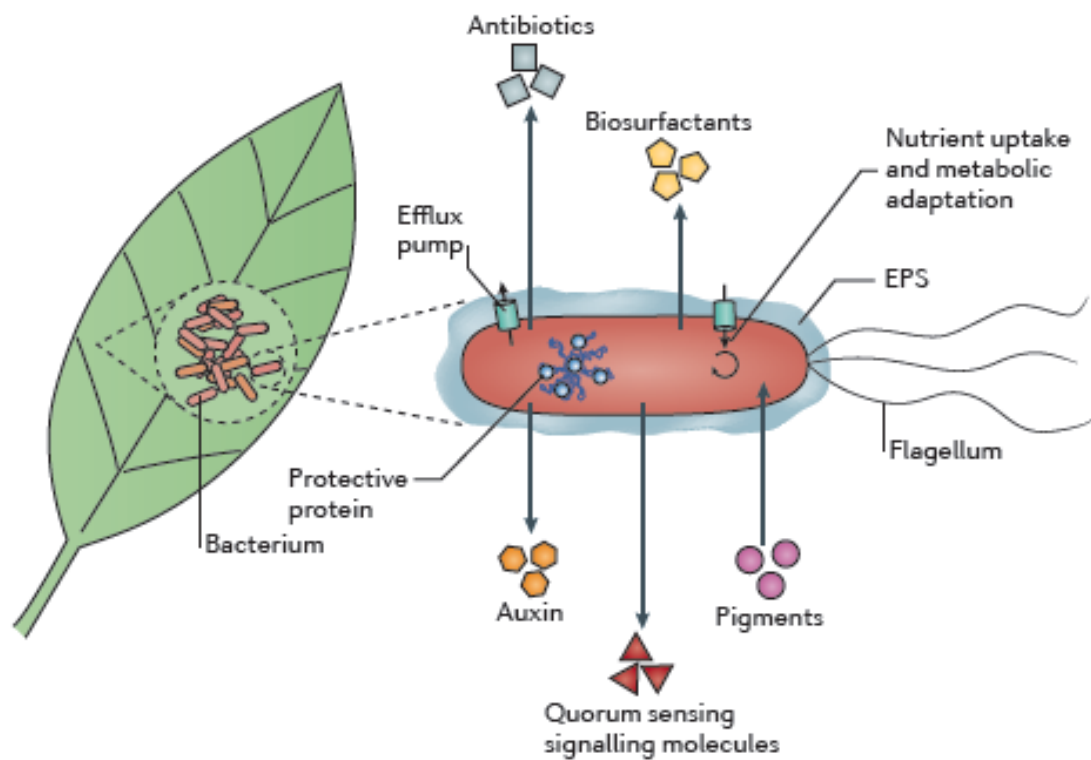


Figure 7. Schéma récapitulatif des principaux traits microbiens requis pour l'adaptation des bactéries épiphytes à la survie en surface de feuilles (Vorholt, 2012).

1.3 Stratégies déployées par les bactéries pour coloniser la phyllosphère

Afin de survivre et de se multiplier dans cet environnement, les bactéries épiphytes ont développé deux stratégies majeures : (i) une stratégie de tolérance qui consiste en la capacité des bactéries à tolérer ou à s'adapter à l'exposition directe aux stress environnementaux (rayonnements UV, manque d'eau et inaccessibilité des nutriments), et (ii) une stratégie d'évitement qui consiste à exploiter et à coloniser des niches protégées de ces stress. Par comparaison avec les bactéries saprophytes qui utilisent plutôt la stratégie de tolérance, les bactéries phytopathogènes foliaires ont la capacité de développer les deux stratégies, ce qui leur permet de s'installer et de coloniser ultérieurement les tissus foliaires (Beattie et Lindow, 1995). Par ailleurs, ces stratégies passent par la mise en place de traits microbiens spécifiques permettant aux bactéries épiphytes de s'adapter aux stress environnementaux au niveau de la phyllosphère (Figure 7) (Vorholt, 2012). Les gènes qui sont exprimés et impliqués dans la survie épiphyte des bactéries ont été tout particulièrement étudiés chez *P. syringae* pv. *syringae* (souche B728a), agent phytopathogène foliaire sur haricot (Lindow *et al.*, 1993 ; Marco *et al.*, 2005 ; Yu *et al.*, 2013). Les principaux gènes exprimés au niveau de la phyllosphère sont les gènes de chimio-tactisme, de production de surfactants, de mobilité, de production de polysaccharides, de transport et d'utilisation du carbone.

1.3.1 Stratégies de tolérance : Production de composés bioactifs (résistance aux stress *versus* adaptation métabolique)

Une des caractéristiques de la majorité des bactéries épiphytes consiste en la production de pigments tels les caroténoïdes et les xanthomonadines. Ces pigments neutralisent les espèces réactives de l'oxygène générées par les rayonnements UV et s'avèrent par conséquent une des stratégies utilisées par les bactéries épiphytes pour se protéger contre les UV (Jacobs *et al.*, 2005 ; Rajogopal *et al.*, 1997 ; Sundin et Jacobs, 1999). L'activation des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN bactérien est un autre mécanisme qui permet aux bactéries épiphytes de mieux tolérer les rayonnements solaires (Gunasekera et Sundin, 2006 ; Jacobs *et al.*, 2005). D'autre part, les bactéries épiphytes doivent dégrader certains composés tels que les phénylpropanoïdes qui sont sécrétés au niveau de la phyllosphère et impliqués dans les défenses de la plante. A cet effet, les populations épiphytes de *P. syringae* pv. *syringae* sur-expriment des gènes codant des protéines impliquées dans la dégradation de la phénylalanine (Yu *et al.*, 2013).

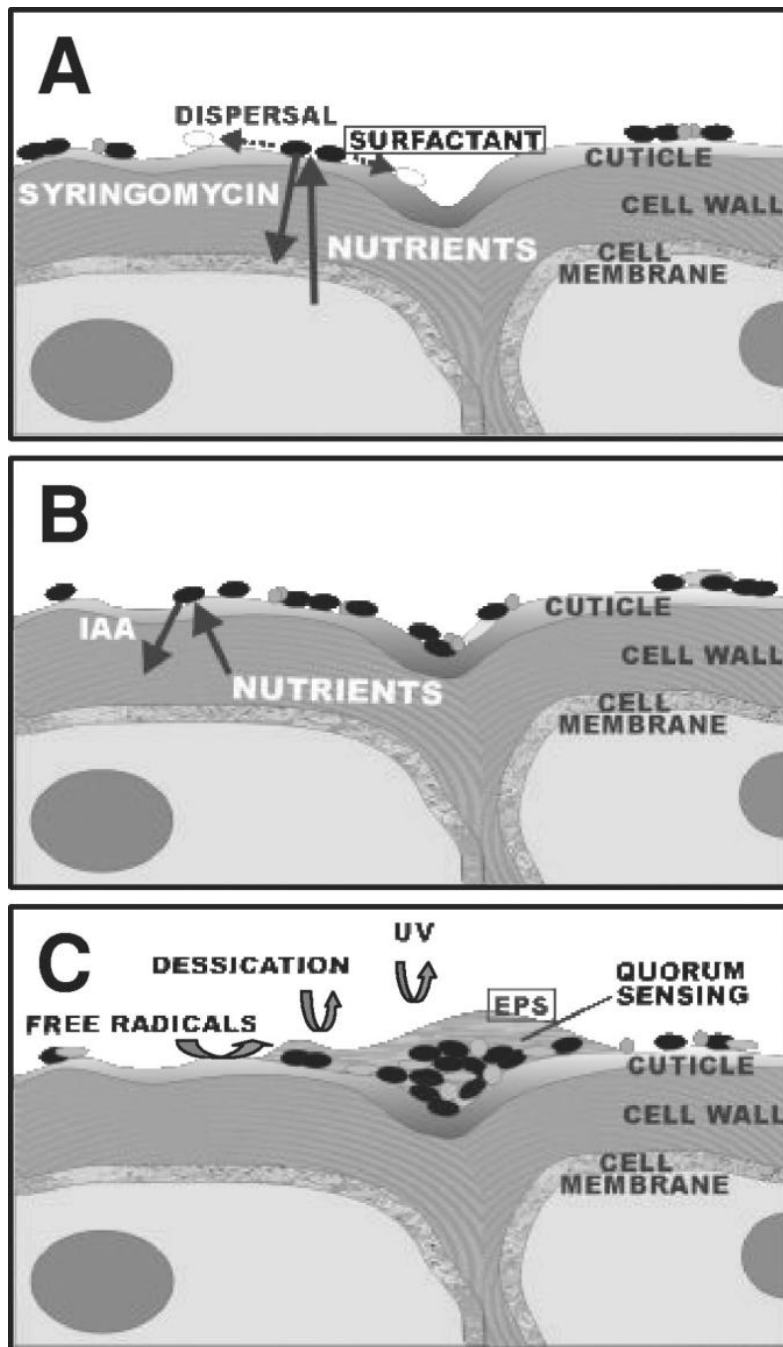


Figure 8. Représentation schématique des différentes hypothèses de la modification des propriétés de la phyllosphère par les bactéries épiphytes (Lindow et Brandl, 2003). (A) Relargage des nutriments en surface des feuilles suite à la production de la syringomycine qui agit comme une phytotoxine mais aussi comme un surfactant, ce qui favorise la mobilité des bactéries. (B) La production d'auxine par les bactéries permet le relargage d'oligosaccharides à partir des cellules végétales. (C) La production d'exopolysaccharides et la formation d'agrégats permet aux bactéries de se protéger des stress environnementaux.

La dessiccation et l'inaccessibilité des nutriments au niveau de la phyllosphère sont d'autres facteurs limitants auxquels les bactéries épiphytes doivent s'adapter. Afin d'exploiter au mieux la phyllosphère, de nombreuses espèces de bactéries épiphytes en modifient ses propriétés en produisant des composés bioactifs et en formant des agrégats (cf. paragraphe 1.3.2.2). Parmi les composés bioactifs synthétisés par les bactéries épiphytes (Figure 8), on peut citer :

- Les bio-surfactants produits par les *Pseudomonas* (par exemple la syringafactine et l'acide alcanolique produits par *P. syringae* pv. *syringae*) permettent d'augmenter la perméabilité de la cuticule. L'eau et les nutriments sont par conséquent beaucoup plus disponibles pour les bactéries épiphytes (Hutchison et Johnstone, 1993 ; Lindow et Brandl, 2003 ; Schreiber *et al.*, 2005). De plus, les surfactants agissent comme des lubrifiants et facilitent la mobilité de type "swarming" des bactéries vers des sites plus riches en nutriments. Ainsi, une coordination entre la production de surfactants et la formation du flagelle a été récemment démontrée (Berti *et al.*, 2007 ; Burch *et al.*, 2012 ; Xu *et al.*, 2012).

- La production de toxines est une autre stratégie développée par les bactéries épiphytes pour augmenter la disponibilité des nutriments (Figure 8A). En effet, les souches épiphytes de *P. syringae*, y compris celles qui ne sont pas phytopathogènes, produisent une toxine appelée syringomycine. Cette toxine permet aux souches épiphytes d'augmenter le transfert d'ions au travers des membranes plasmiques des cellules de la plante hôte par la formation de canaux ioniques. Ce phénomène permet d'améliorer le relargage des nutriments à partir des cellules de la plante (Hutchison *et al.*, 1995). La syringomycine joue par ailleurs également un rôle de surfactant en surface des feuilles (Hutchison *et al.*, 1995).

- La synthèse d'hormones de croissance végétales, comme l'acide 3-indole acétique chez les bactéries épiphytes du genre *Pseudomonas* et les *Xanthomonas*, permet, à des concentrations faibles, de détruire les parois cellulaires et de stimuler ainsi le relargage des mono- et oligosaccharides à partir des cellules végétales (Figure 8B) (Fett *et al.*, 1987 ; Lindow et Brandl, 2003 ; Lindow *et al.*, 1998).

- L'accumulation chez les *Pseudomonas* spp., par synthèse *de novo* ou assimilation de composés osmoprotecteurs, de solutés tels que le tréhalose, la choline et la betaine les protègent contre la dessiccation en surface des feuilles (Chen et Beattie, 2008 ; Freeman *et al.*, 2010).

1.3.2 Stratégies d'évitement

Afin d'éviter les stress environnementaux, les bactéries épiphytes ne colonisent pas uniformément la surface foliaire, mais elles se multiplient dans des niches protégées qui sont épargnées de ces stress. Les sites les plus fréquemment colonisés par les bactéries sont situés au niveau des dépressions le long des nervures, à la base des trichomes, au niveau des stomates et des hydathodes (Figure 6). A titre d'exemple, les cellules de *P. syringae* s'agrègent en forte densité exclusivement à la base des trichomes glandulaires (Monier et Lindow, 2003). Ces sites présentent en effet des conditions optimales pour la multiplication des bactéries épiphytes car ils sont riches en eau et en nutriments (Leveau et Lindow, 2001a et b; Miller *et al.*, 2001 ; Schonherr, 2006). Au niveau de ces sites, les bactéries s'agrègent souvent en micro-colonies et forment des biofilms (Jacques *et al.*, 2005 ; Monier et Lindow, 2003). Etant donné que les bactéries épiphytes sont localisées préférentiellement au niveau de sites proches ou au niveau des ouvertures naturelles, leur pénétration dans les tissus foliaires en sera d'autant facilitée par la suite.

1.3.2.1 Chimio-tactisme, mobilité et adhésion : Pré-requis pour la survie au niveau de la phyllosphère

1.3.2.1.1 Chimio-tactisme et mobilité

Comme c'est le cas pour les bactéries phytopathogènes rhizosphériques (*Agrobacterium tumefaciens* et *Ralstonia solanacearum*), les agents phytopathogènes foliaires sont attirés par chimiotactisme vers les sites riches en nutriments. Ce trait microbien permet aux bactéries (i) de percevoir les stimuli environnementaux, puis (ii) de se déplacer vers un habitat où les conditions sont favorables et (iii) de localiser *in fine* les sites de pénétration (stomates, hydathodes et blessures) pour pouvoir coloniser leur plante hôte (Bren et Eisenbach, 2000 ; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011a). Ainsi, *Dickeya dadantii* est attiré par l'acide jasmonique qui est produit au niveau des blessures, et cette molécule permettrait à la bactérie de diriger son mouvement et de pénétrer ensuite dans les tissus foliaires à travers les blessures (Antúnez-Lamas *et al.*, 2009).

Les signaux environnementaux sont détectés principalement par des "Methyl-accepting Chemotaxis Proteins" qui sont des chémorécepteurs ancrés dans la membrane bactérienne. La perception des signaux par ces senseurs permet aux bactéries, suite à une cascade de transduction de signal, de réguler le sens et la fréquence de rotation du flagelle et de contrôler

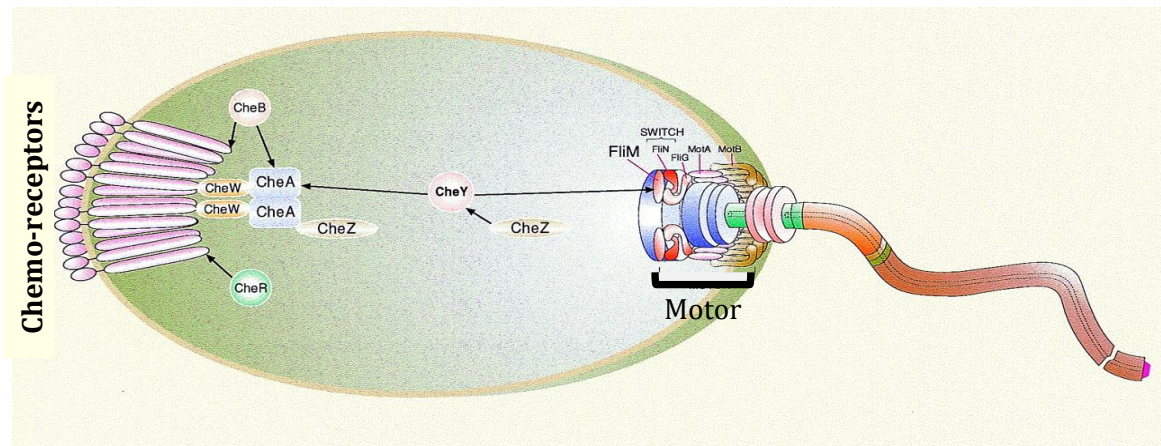


Figure 9. Représentation schématique simplifiée de la voie de transduction du signal chimio-tactique chez les bactéries (Bren et Eisenbach, 2000). Les chémorécepteurs, ancrés dans la membrane des bactéries, détectent les signaux environnementaux et interagissent en conséquence avec les protéines cytoplasmiques Che. Ces protéines transmettent le signal à l'intérieur de la cellule *via* une cascade de phosphorylation. Une fois phosphorylée, la protéine CheY interagit avec le moteur du flagelle pour contrôler la mobilité des bactéries.

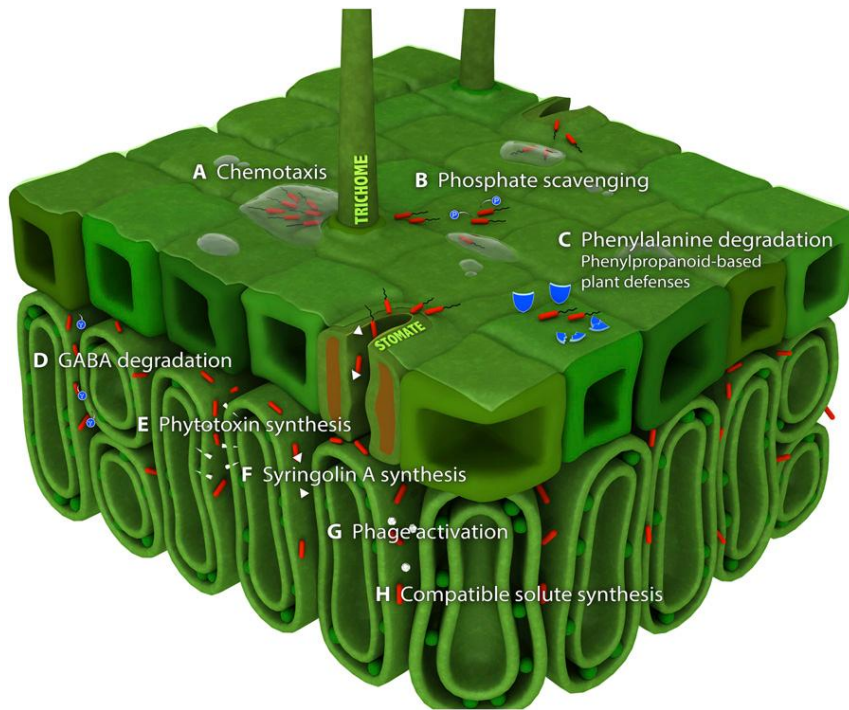


Figure 10. Représentation schématique d'une coupe transversale d'une feuille montrant les principaux traits microbiens de la souche B728a de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* qui sont induits en surface des feuilles et ceux qui sont induits dans l'apoplaste (Yu *et al.*, 2013). En se basant sur des analyses de transcriptomique, les cellules épiphytes de *P. syringae* sont (A) mobiles et utilisent le chimio-tactisme pour se déplacer et localiser les sites riches en nutriments. Celles-ci sont particulièrement actives dans (B) l'utilisation du phosphate disponible en surface des feuilles et (C) dans la dégradation de la phénylalanine, une molécule dont dérivent les phénylpropanoïdes, composés impliqués dans les défenses de la plante. En revanche, les cellules bactériennes apoplastiques sont particulièrement actives dans (D) la dégradation de l'acide gamma-amino butyrique (GABA), (E) la production de phytotoxines et d'autres métabolites secondaires, (F) la production de la syringoline A, un métabolite qui supprime les réactions de défense en surface des feuilles, entre autre au niveau des stomates, et (G) l'activation des phages. Enfin, bien que le stress osmotique soit une caractéristique des deux environnements, (H) les cellules bactériennes apoplastiques s'avèrent beaucoup plus exposées à ce stress car elles sur-expriment les gènes impliqués dans la synthèse de solutés tels que le tréhalose.

ainsi leur mobilité (Figure 9) (Bai *et al.*, 2010 ; Bren et Eisenbach, 2000 ; Jarrell et McBride, 2008). Les bactéries vont par conséquent diriger leur mouvement vers les molécules chémo-attractives et éviter les molécules chémo-répulsives.

Récemment, une étude transcriptomique a permis de montrer que les gènes impliqués dans le chimiotactisme, ainsi que ceux impliqués dans la mobilité (formation du flagelle), étaient induits dans les cellules de *P. syringae* pv. *syringae* épiphytes mais faiblement induits voire réprimés dans l'apoplaste (Figure 10) (Yu *et al.*, 2013). Ce résultat permet de mettre en évidence d'une part la distribution inégale des nutriments au niveau de la phyllosphère, et d'autre part une relocalisation active de ces bactéries vers des micro-habitats riches en nutriments (ou vers les sites d'entrée à l'apoplaste). Un mutant non mobile (mutation au niveau du gène *fliH* indispensable pour l'assemblage du filament flagellaire) d'*Erwinia amylovora* (agent causal du feu bactérien) est virulent au même titre que la souche sauvage lorsqu'il est pulvérisé au niveau de feuilles de pommier présentant des blessures. En revanche, ce même mutant s'avère beaucoup moins virulent sur des feuilles ne présentant pas de blessures, ce qui suggère une capacité réduite à se déplacer et à atteindre les sites de pénétration (ouvertures naturelles) (Cesbron *et al.*, 2006). Ces résultats révèlent également l'importance de la mobilité dans la colonisation de la phyllosphère par les bactéries épiphytes. Par ailleurs, la mobilité permet aux bactéries d'envahir des sites autres que le site d'infection primaire.

Bien que la majorité de T~~B~~D~~T~~ (pour TonB-Dependants Transporters) soient impliqués dans le transport actif de grosses molécules, notamment les composés carbonés, ces derniers peuvent être utilisés par les bactéries pour percevoir les signaux environnementaux (en particulier la disponibilité des nutriments) (Koebnik, 2005). Une analyse de métagénomique réalisée au niveau des feuilles de trois espèces végétales a montré que les T~~B~~D~~T~~ sont sur-exprimés chez les populations bactériennes épiphytes (Delmotte *et al.*, 2009). Les auteurs de ces travaux suggèrent que cette sur-représentation permet aux bactéries épiphytes de mieux s'adapter à la phyllosphère. En outre, *X. campestris* pv. *campestris* possède un système C~~U~~T (pour Carbohydrate Utilization with TBDT systems) qui est impliqué dans l'utilisation de composés carbonés, et qui s'avère indispensable pour la multiplication optimale de la bactérie en surface des feuilles (Déjean *et al.*, 2013).

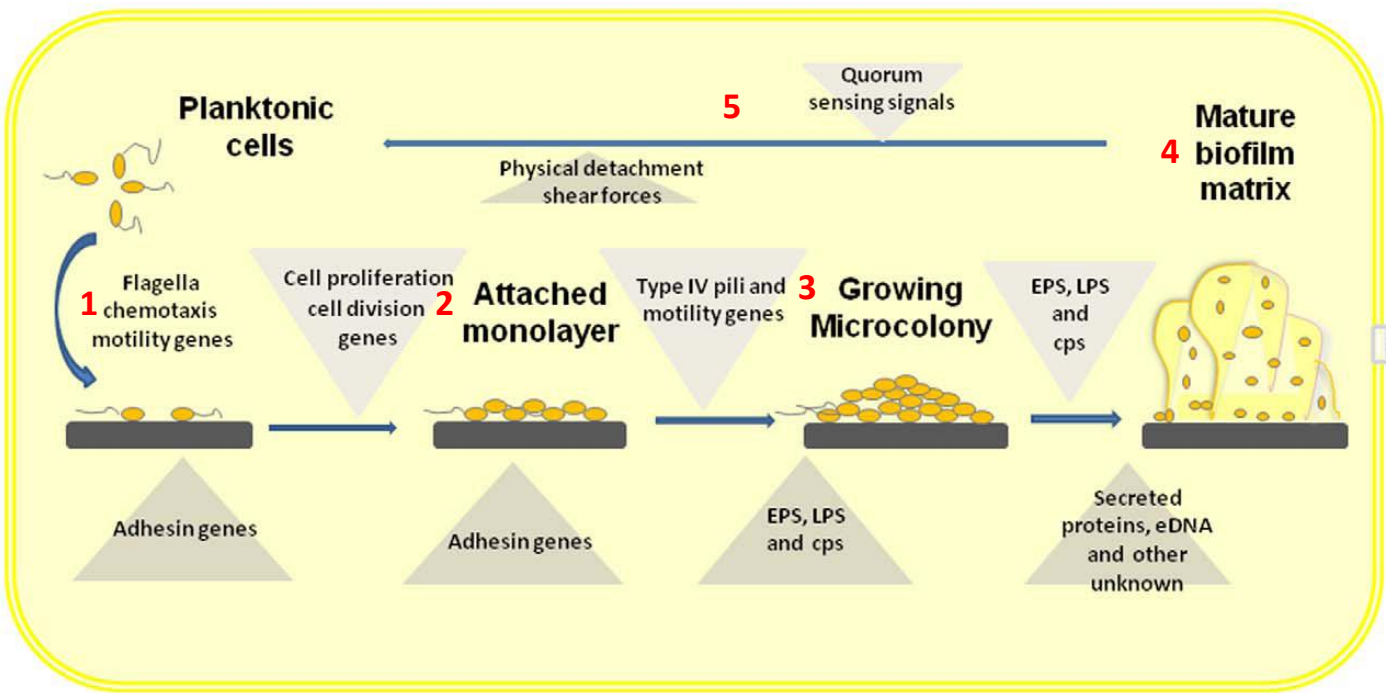


Figure 11. Représentation du processus de formation d'un biofilm chez *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Li et Wang, 2011a).

(1) Détection et déplacement vers les sites riches en nutriments: les bactéries planctoniques détectent les sites riches en nutriments par chimio-tactisme et se déplacent vers ces derniers par mobilité flagellaire. **(2) Attachement initial des bactéries aux surfaces:** les bactéries s'installent et se multiplient au niveau de ces sites, et s'attachent par des adhésines aux surfaces d'où formation d'une mono-couche bactérienne. **(3) Développement d'une microcolonie ou d'un biofilm pré-mature:** la production d'exopolysaccharides (EPS), de lipopolysaccharides (LPS) et de CPS ('capsular polysaccharides') favorise l'attachement des bactéries entre-elles et le développement vertical de la microcolonie. **(4) Formation d'un biofilm mature:** la production d'EPS, de LPS et de CPS ainsi que d'autres protéines permet la maturation du biofilm. **(5) Dispersion du biofilm:** la transition d'un état sessile vers un état planctonique se fait par le quorum-sensing (QS), un mécanisme taille de population-dépendant.

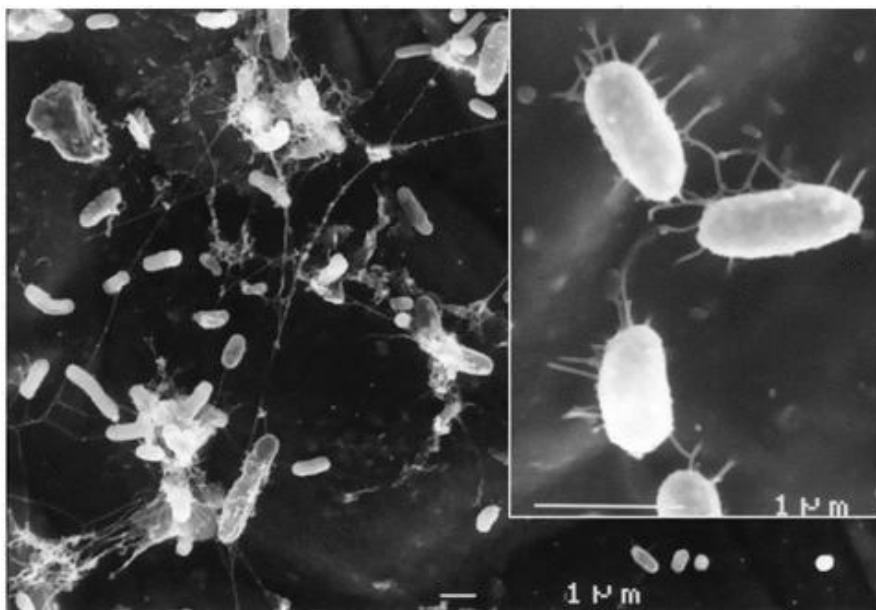


Figure 12. Observation en microscopie électronique d'une feuille de haricot colonisée par *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011b). Les bactéries adhèrent à la surface foliaire à l'aide d'adhésines qui sont des structures filamenteuses présentes en surface des bactéries.

1.3.2.1.2 L'adhésion

La détection d'une niche favorable est suivie par l'adhésion des bactéries entre-elles et à la surface des feuilles. Cette étape d'adhésion est un pré-requis pour l'agrégation des bactéries en structure de type biofilms (Figure 11) (Stoodley *et al.*, 2002). Le chimiotactisme et l'adhésion sont interconnectés puisque la formation de biofilm est régulée par un mécanisme taille de population-dépendant appelé le quorum-sensing (QS) (Dow *et al.*, 2003). Chez la plupart des bactéries, le QS régule négativement la mobilité des bactéries, mais régule positivement l'agrégation et la formation de biofilms (Dow *et al.*, 2003 ; Quinones *et al.*, 2004 et 2005 ; Xu *et al.*, 2012). La répression des gènes impliqués dans la formation du flagelle par le QS se traduit par une transition réversible du mode de vie des bactéries d'un état planctonique vers un état agrégé.

Afin de s'agréger entre-elles ou à la phyllosphère, les bactéries doivent d'abord adhérer aux surfaces. Les structures adhésives présentes en surface des bactéries leur permettent de s'attacher mieux à la phyllosphère et de ne pas être lessivées par les pluies intenses (Figure 12). L'attachement aux surfaces requiert principalement deux types de protéines de surface appelées adhésines fibrillaires et adhésines non-fibrillaires. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides peuvent également être impliqués dans l'adhésion (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011b).

Les adhésines fibrillaires comprennent plusieurs types de pili ou fimbriae et notamment les pili de type IV (**Tfp**), structures filamenteuses codées par les gènes *pil*. Les Tfp sont des homopolymères d'une protéine unique appelée la piline (codée par *pilA*) (Gerlach et Hensel, 2007; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011b). Ces structures de surface permettent la mobilité reptatoire ou "twitching motility" des cellules bactériennes. En effet, une fois bien adhérents à la surface, ces pili sont capables de se rétracter en permettant à la cellule bactérienne d'avancer (Jarrell et McBride, 2008). Ce même mécanisme permet l'attachement des bactéries à différentes surfaces mais aussi entre-elles. **Les adhésines non-fibrillaires** sont également des protéines de surface et elles sont sécrétées *via* le système de sécrétion de type V. Ces protéines requièrent des auto-transporteurs trimériques (comme par exemple les protéines XadA et YadA) et un système TPS (pour **T**wo-**P**artner **S**ecretion) (comme l'hémagglutinine FhaB et la protéine YapH) (Gerlach et Hensel, 2007; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011b).

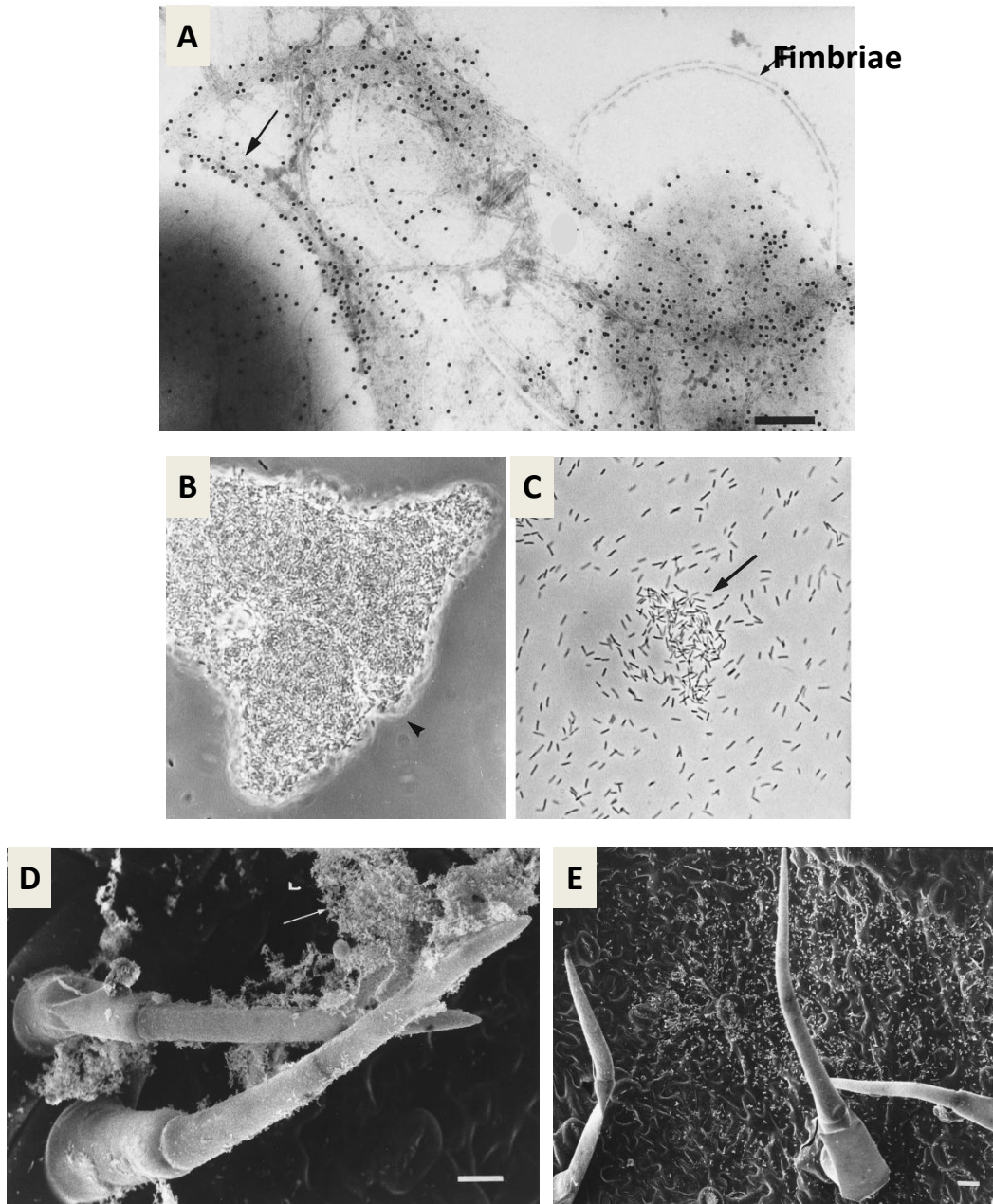


Figure 13. Rôle des adhésines fibrillaires (gène *fimA*) de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* dans la formation d'agrégats (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997). (A) Fimbriae (flèches) présents en surface d'une cellule de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Formation d'agrégats *in vitro* par la souche sauvage (B) et par le mutants *fimA* de *X. axonopodis* (C). La souche sauvage (D) adhère et forme de large agrégats au niveau des trichomes alors que le mutant *fimA* (E) est affecté dans sa capacité à former des agrégats et à adhérer aux trichomes.

Chez les bactéries phytopathogènes foliaires, et notamment chez les *Xanthomonas*, les adhésines fibrillaires et non-fibrillaires ont un rôle dans l'attachement aux surfaces et par conséquent dans l'agrégation des cellules bactériennes en biofilm (Büttner et Bonas, 2009 ; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011b). A titre d'exemple, les pili de type IV de *X. campestris* pv. *hyacinthi* permettent l'attachement de cette espèce bactérienne aux stomates et aux hydathodes de sa plante hôte (van Doorn *et al.*, 1994). C'est également le cas pour *P. syringae* pv. *phaseolicola* sur le haricot (Romantschuk et Bamford, 1986). En revanche, la mutation du gène *fimA* (homologue de *pilA*) chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* s'avère sans effet significatif sur la virulence et l'attachement de cette bactérie en surface des feuilles de tomate (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997). Un gène *fimA* fonctionnel est cependant nécessaire pour la formation de biofilm *in vitro* et en surface des feuilles de tomate (Figure 13), mais aussi pour mieux tolérer les rayonnements UV. D'autre part, des observations en microscopie électronique ont permis de révéler que, contrairement à la souche sauvage, le mutant *fimA* est affecté dans sa capacité à adhérer et à former des agrégats au niveau des trichomes (Figure 13) (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997).

De même, les adhésines non-fibrillaires de *D. dadantii*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. axonopodis* pv. *citri* et *X. fuscans* subsp. *fuscans* ont un rôle dans l'attachement à la surface foliaire ainsi que dans la formation de biofilms (Darsonval *et al.*, 2009 ; Das *et al.*, 2009 ; Gottig *et al.*, 2009 ; Ray *et al.*, 2002 ; Rojas *et al.*, 2002). A titre d'exemple, un mutant du gène *xadA1* (homologue de *yadA* de *Yersinia* spp.) de *X. oryzae* pv. *oryzae* n'est plus capable de s'attacher et de coloniser la phyllosphère du riz (Das *et al.*, 2009 ; Ray *et al.*, 2002). Par ailleurs, ce mutant produit moins d'EPS que la souche sauvage (Ray *et al.*, 2002).

La mutation du gène *fhaB* (qui code une hémagglutinine) chez *X. axonopodis* pv. *citri* a permis de montrer que cette adhésine est non seulement impliquée dans l'attachement et dans la colonisation des feuilles d'agrumes, mais aussi dans l'attachement des cellules bactériennes entre-elles et dans la formation de biofilms. En revanche, contrairement à ce qui a été observé pour le mutant *xadA1*, le mutant *fhaB* produit beaucoup plus d'EPS que la souche sauvage, ce qui se traduit par une mobilité de type "swarming" plus importante chez le mutant que chez la souche sauvage (Gottig *et al.*, 2009). Chez certaines bactéries épiphytes, les adhésines fibrillaires et non-fibrillaires sont des structures indispensables pour l'attachement, la formation d'agrégats en surface de feuilles et *in fine* pour la colonisation des tissus foliaires.

1.3.2.2 La formation de biofilms: Une structure protectrice pour les bactéries épiphytes

Au niveau de la phyllosphère, les bactéries épiphytes sont fréquemment associées à de larges agrégats appelés biofilms (Jacques *et al.*, 2005 ; Monier et Lindow, 2003 et 2004 ; Morris *et al.*, 1998). Dans une structure de type biofilm, les bactéries s'agrègent entre-elles tout en adhérant à une surface biotique (la phyllosphère par exemple) ou abiotique. Le biofilm peut être constitué de plusieurs espèces bactériennes voire même d'espèces fongiques, ce qui favorise les interactions synergiques ainsi que l'échange de matériel génétique (Lindow et Brandl, 2003). Les étapes de formation d'un biofilm sont illustrées dans la figure 11. L'agrégation en structure de type biofilm constitue un avantage pour les bactéries car elle leur permet de tamponner leur environnement et, *in fine*, de mieux résister aux stress environnementaux (en particulier la dessiccation et les composés antimicrobiens d'origine végétale ou microbienne). Ainsi, les populations bactériennes de *X. fuscans* subsp. *fuscans* (agent causal de la graise commune du haricot) agrégées en biofilm sont plus stables en surface des feuilles du haricot et tolèrent mieux le stress hydrique que les populations planctoniques (Jacques *et al.*, 2005). Il en est de même pour *P. syringae* pv. *syringae* qui, suite à la formation de biofilms, résiste mieux à la dessiccation et aux peroxydes d'hydrogène (H₂O₂) (Monier et Lindow, 2003 ; Quinones *et al.*, 2005). Cet effet protecteur de l'agrégation bactérienne est obtenu grâce à la formation des agrégats au niveau de sites plus riches en nutriments, et aussi grâce à la présence d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS) qui est une composante essentielle et majeure du biofilm. Sécrétée par les bactéries, la matrice d'EPS est non seulement indispensable pour la formation du biofilm mais également pour la survie épiphyte des bactéries. En effet, les souches de *Xanthomonas* spp. et de *P. syringae* qui ne produisent pas d'EPS (à savoir le xanthane chez les *Xanthomonas* et l'alginate chez les *Pseudomonas*) sont sévèrement affectées dans leur capacité de survie épiphyte en surface des feuilles (Dunger *et al.*, 2007 ; Kemp *et al.*, 2004 ; Rigano *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 1999). Etant donnée sa nature hydratée et anionique, la matrice d'EPS sert à retenir l'eau et à capter les minéraux ainsi que les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne (Chang *et al.*, 2007), ce qui permet d'augmenter l'activité métabolique des bactéries et d'améliorer leur tolérance à différents stress.

La formation de biofilms est régulée par le QS, un mécanisme taille de population-dépendant (Danhorn et Fuqua, 2007 ; Dow *et al.*, 2003). Ce système de signalisation (cf. paragraphe 2.3.7) dépend de la production de molécules signal telles que le DSF (pour **D**iffusible **S**ignal **F**actor) produit par les *Xanthomonas* et *Xyllela fastidiosa*, et les N-acyl

homosérine lactones (AHLs) chez les *Erwinia* et les *Pseudomonas* (Danhorn et Fuqua, 2007). Chez *P. syringae* pv. *syringae*, les AHLs s'accumulent plus rapidement au niveau des feuilles sèches qu'au niveau des feuilles humides de haricot. Cette caractéristique permet aux bactéries de former des biofilms à des densités bactériennes moins élevées que celles observées en absence de stress, et donc de mieux survivre en tant qu'épiphyte dans des conditions de dessiccation (Dulla et Lindow, 2008).

La dispersion des cellules bactériennes (Figure 11) constituant un biofilm constitue la dernière étape de développement d'un biofilm. Elle est cruciale pour la colonisation de nouveaux hôtes et/ou la pénétration et l'envahissement d'autres tissus. Chez *X. campestris* pv. *campestris*, l'enzyme endo-B-(1,4)-mannanase est nécessaire pour la transition d'un état sessile vers un état planctonique. La production de cette enzyme est positivement régulée par le système de communication cellulaire *rpf*/DSF (Dow *et al.*, 2003).

1.3.2.3 Sécrétion d'effecteurs par le système de sécrétion de type III Hrp et de molécules bioactives

1.3.2.3.1 Sécrétion de molécules bioactives : Facteurs de transition d'un mode de vie épiphyte vers un mode de vie endophyte

Afin de rentrer dans l'apoplaste, les bactéries phytopathogènes foliaires doivent contourner les mécanismes de défense mis en place au niveau des sites de pénétration, notamment au niveau des stomates. Ces derniers jouent un rôle important dans l'immunité des plantes. En effet, suite à la détection d'un agent pathogène et plus précisément des MAMP (pour « **M**icrobe-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns ») (ex. la flagelline flg22 ou les lipopolysaccharides), les stomates se ferment rapidement par un mécanisme actif (en une heure après exposition aux bactéries) et empêchent ainsi l'entrée des bactéries dans l'apoplaste (Melotto *et al.*, 2006 et 2008 ; Zeng *et al.*, 2010a et b). Les bactéries phytopathogènes foliaires ont donc développé des stratégies leur permettant de ré-ouvrir les stomates et *in fine* de pénétrer dans l'apoplaste. Ces stratégies font intervenir des phytotoxines et des molécules bioactives qui sont sécrétées par les bactéries. La coronatine, une phytotoxine sécrétée par *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000) et d'autres pathovars de *P. syringae*, est suffisante et nécessaire pour contourner la fermeture des stomates induites par les MAMP (Melotto *et al.*, 2006). En activant une cascade de signalisation, cette phytotoxine inhibe l'accumulation de l'acide salicylique qui, avec l'acide abscissique, est requise pour la fermeture des stomates induites par les MAMP (Zheng *et al.*, 2012). De son côté, *X.*

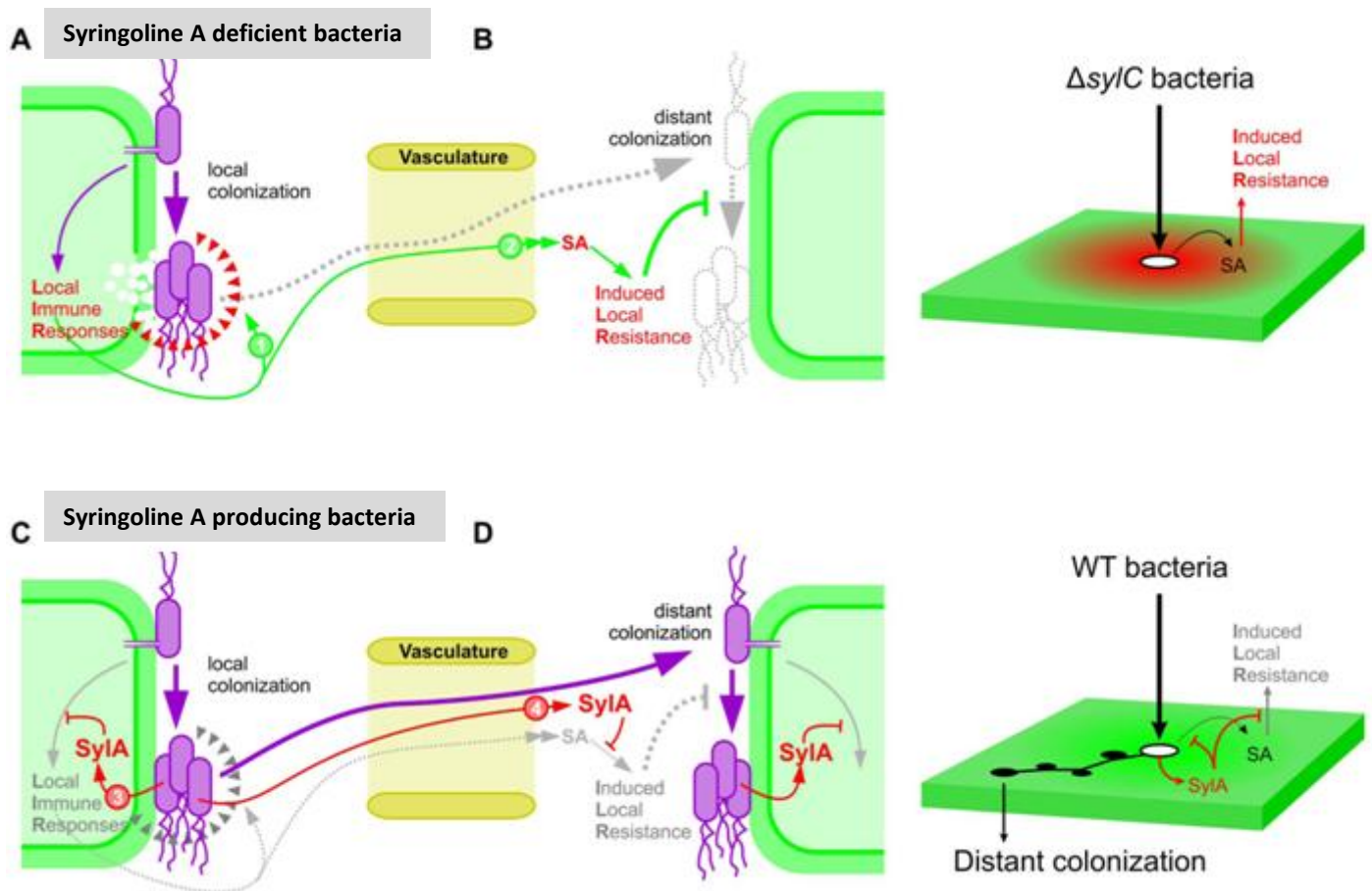


Figure 14. Représentation schématique du mode d'action de la syringoline A produite par *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Misas-Villamil et al., 2013).

(A-B) Les mutants *sylA* qui ne produisent pas la syringoline déclenchent les réponses immunitaires de la plante, ce qui induit localement une HR et une résistance induite (dépend de la voie de signalisation de l'acide salicylique) dans les tissus adjacents. La pénétration des bactéries à travers les blessures est donc inhibée par les défenses de la plante mises en place localement (1) et dans les tissus adjacents (2). (C-D) La souche sauvage de *P. syringae* produit la syringoline A, une molécule qui inhibe les réponses immunitaires de la plante mises en place au niveau du premier site d'infection (3). De plus, la syringoline A diffuse dans les tissus de la plante et bloque la résistance induite par la voie de l'acide salicylique (4). Ainsi, les bactéries qui produisent la syringoline A peuvent contourner les mécanismes de défense au niveau des blessures et coloniser les tissus adjacents.

campestris pv. *campestris* secrète une petite molécule dont le rôle est aussi de contourner la fermeture des stomates induites par les MAMP ou par l'acide abscissique. La production de cette molécule (dont la nature reste à préciser) est régulée par les gènes *rpf* (pour « **r**egulation of **p**athogenicity **f**actors ») impliqués dans la communication entre cellules bactériennes (Gudesblat *et al.*, 2009).

De même, deux pathovars de *P. syringae* pv. *syringae* produisent une petite molécule appelée syringoline A qui leur permet de contourner les mécanismes de défense exprimés au niveau des stomates et des blessures. En plus de l'induction de la réouverture des stomates qui se ferment suite à la détection des MAMP (Schellenberg *et al.*, 2010), la syringoline A facilite l'entrée des *Pseudomonas* à travers les blessures en bloquant les mécanismes de défense induits localement (réaction d'hypersensibilité et dépôt de callose), mais aussi ceux induits dans les tissus adjacents (résistance induite qui dépend de la voie de signalisation de l'acide salicylique) (Figure 14) (Misas-Villamil *et al.*, 2013). Cette molécule agit comme un inhibiteur du protéasome dont la fonction apparaît essentielle dans la mise en place des réactions de défense au niveau des stomates ou des blessures. Le protéasome pourrait avoir un rôle dans la transcription des gènes de défenses induit par la voie de signalisation de l'acide salicylique. En effet, le régulateur NRP1 requiert un protéasome fonctionnel pour qu'il soit sous sa forme phosphorylée et activer ainsi la transcription des gènes de défense sous le contrôle de la voie de l'acide salicylique (Schellenberg *et al.*, 2010). De même, la syringoline interférerait aussi avec la voie de signalisation de l'acide salicylique (Misas-Villamil *et al.*, 2013).

1.3.2.3.2 Le Système de sécrétion de type III Hrp et ses effecteurs

Suite à la découverte de l'existence d'un système de sécrétion de type III (SST3) Hrp fonctionnel chez des espèces de *Pseudomonas* saprophytes (Clarke *et al.*, 2010 ; Preston, 2001), Lindow et Brandl (2003) ont suggéré l'implication du SST3 dans la survie et la multiplication des bactéries épiphytes au niveau de la phyllosphère. Ainsi, ce système de sécrétion permettrait aux bactéries épiphytes de modifier les propriétés de la phyllosphère *via* l'insertion de la seringue et l'injection de protéines effectrices dans les cellules épidermiques. Contrairement à *P. syringae* pv. *tomato* dont les effecteurs du SST3 sont induits uniquement au niveau de l'apoplaste (Boureau *et al.*, 2002), ceux de *P. syringae* pv. *syringae* sont exprimés au niveau de la phyllosphère avant la pénétration dans l'apoplaste (Lee *et al.*, 2012). Les cellules bactériennes de *P. syringae* pv. *syringae* exprimant ces effecteurs sont

préférentiellement localisées au niveau des jonctions et en surface des cellules épidermiques des feuilles du tabac. Par ailleurs, le SST3 de cette espèce bactérienne s'avère non seulement nécessaire pour une multiplication optimale de la bactérie en surface des feuilles, mais également pour la formation d'agrégats (Lee *et al.*, 2012). Certains effecteurs (HopZ3 et HopAA1) sécrétés par le SST3 de cette bactérie sont également impliqués dans la survie épiphyte (Lee *et al.*, 2012 ; Vinatzer *et al.*, 2006). En effet, la mutation de chacun de ces effecteurs provoque non seulement une multiplication plus importante des bactéries en surface foliaire, mais aussi une augmentation de la taille des agrégats. Ces effecteurs permettent donc de maintenir la population épiphyte à un seuil donné, vraisemblablement en induisant les mécanismes de défense de la plante. Selon Lee *et al.* (2012), l'implication du SST3 (ainsi que ses effecteurs) dans la survie épiphyte pourrait être restreinte aux bactéries ayant une phase épiphyte prolongée comme *P. syringae* pv. *syringae* et *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Par ailleurs, les mutants de *P. syringae* pv. *syringae* affectés dans les gènes *hrcC* et *hrpJ* sont altérés dans leur capacité à coloniser la phyllosphère, mais aussi les espaces intercellulaires (Deng et Huang, 1999).

Chez *X. fuscans* subsp. *fuscans*, les gènes de structure du SST3 (*hrpB2*, *hrcJ*, *hrcR*, *hrcT*, et *hrcV*) ne sont pas impliqués dans la survie épiphyte de cette espèce bactérienne. En revanche, la survie épiphyte de cette bactérie sur les feuilles de haricot dépend des fonctions régulées par *hrpX* et *hrpG*, des gènes régulateurs du SST3 (Darsonval *et al.*, 2008). HrpG est supposé réguler positivement les gènes impliqués dans l'adhésion, d'où son rôle dans la survie épiphyte de *X. fuscans* subsp. *fuscans*.

2 COLONISATION ENDOPHYTE DE LA PLANTE HÔTE

Après une phase de colonisation épiphyte, les bactéries phytopathogènes pénètrent à l'intérieur des tissus foliaires *via* les ouvertures naturelles (les stomates, les hydathodes ou les nectaires) ou à travers les blessures présentes au niveau de la phyllosphère. La pénétration des bactéries phytopathogènes à l'intérieur des tissus foliaires *via* les ouvertures naturelles a longtemps été considérée, à tort, comme un mécanisme passif. Il s'agit plutôt d'un mécanisme actif car plusieurs facteurs comme les éliciteurs bactériens (la flagelline flg22 et les lipopolysaccharides) modulent l'ouverture et la fermeture des stomates lors de l'infection d'une plante par une bactérie pathogène (Gudesblat *et al.*, 2009 ; Melotto *et al.*, 2006 ; Zeng *et al.*, 2010a et b). Par ailleurs, certaines espèces bactériennes telles que *Xyllela fastidiosa* et

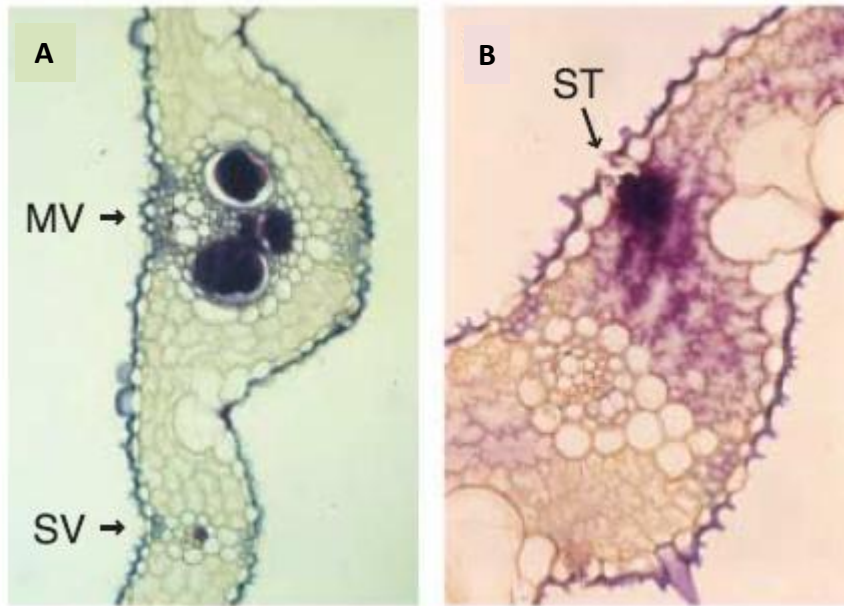


Figure 15. Localisation de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (A) et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (B) au niveau des feuilles de riz (d'après Nino-Liu *et al.*, 2006). Les bactéries sont colorées en noir. *X. oryzae* pv. *oryzae* est localisée au niveau du xylème d'une nervure principale (MV) et d'une nervure secondaire (SV) alors que *X. oryzae* pv. *oryzicola* est localisée au niveau de la chambre sous-stomatique (ST) et dans les espaces intercellulaires du mésophylle.

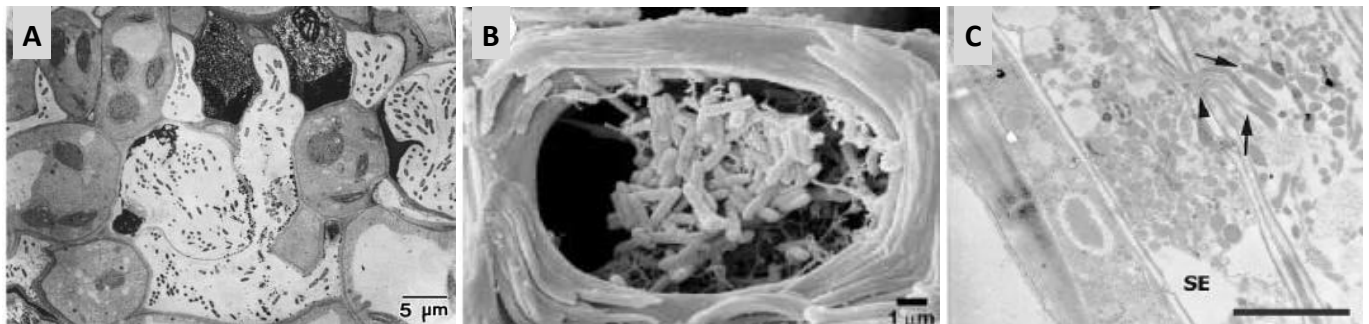


Figure 16. Observations de microscopie électronique montrant la localisation de trois bactéries phytopathogènes. (A) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* est localisée au niveau des espaces intercellulaires du mésophylle foliaire des agrumes (Graham *et al.*, 2004). (B) *Xylella fastidiosa* est localisée au niveau du xylème des agrumes (Alves *et al.*, 2004). (C) Les phytoplasmes (flèches) sont localisés au niveau des tubes criblés du phloème (Christensen *et al.*, 2005).

Tableau 1. Exemples de bactéries phytopathogènes qui colonisent les espaces intercellulaires du mésophylle foliaire (apoplaste).

Groupe	Espèce bactérienne	Maladie provoquée	Référence
Gram - γ-protéobactéries	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	Stries bactériennes du riz (« bacterial leaf streak of rice »)	1
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>	Taches bactériennes des crucifères (« bacterial leaf spot »)	2
	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Gale bactérienne du poivron et de la tomate (« bacterial spot of tomato and pepper »)	3
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	Chancres bactériens des agrumes (« citrus canker »)	4
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	Bactériose vasculaire du manioc (« cassava bacterial blight »)	5
	<i>Xanthomonas translucens</i>	Brûlure bactérienne des céréales (« bacterial leaf streak of cereals »)	6
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Moucheture bactérienne de la tomate (« bacterial speck of tomato »)	7
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Bactérie polyphage/Taches bactériennes du haricot (« brown spot of bean »)	8
	<i>Dickeya dadantii</i> (= <i>Erwinia chrysanthemi</i>)	Bactérie polyphage: Pourriture molle et jambe noire de la pomme de terre (« soft rot and blackleg of potato »)	9

1 : Nino-Liu *et al.*, 2006 ; **2** : Black et Machmud , 1983 ; **3** : Zhang *et al.*, 2009 ; **4** : Graham *et al.*, 2004 ; **5** : Boher *et al.*, 1995 ; **6** : Masuch *et al.*, 1989 ; **7** : Boureau *et al.*, 2002 ; **8** : Rico, 2009 ; **9** : Pérombelon, 2002.

Pantoea stewartii subsp. *stewartii*, ainsi que les phytoplasmes, sont véhiculés par des insectes vecteurs et sont directement déversés dans les faisceaux vasculaires de la plante hôte (Chatterjee *et al.*, 2008a ; Christensen *et al.*, 2005 ; Roper, 2011).

À l'intérieur des tissus de la plante, les bactéries phytopathogènes se multiplient localement dans les espaces intercellulaires du mésophylle encore appelés apoplaste, et/ou dans les faisceaux vasculaires (xylème ou phloème) (Figures 15 et 16). Par comparaison avec la phyllosphère où les bactéries sont sujettes à des fluctuations des conditions environnementales externes, ces différents tissus ou “environnements” représentent à l'échelle d'un microorganisme un vrai champ de bataille dans lequel celui-ci doit faire face à des mécanismes de défense complexes et variés. Les processus mis en place à l'arrivée d'un agent pathogène dans les tissus végétaux vont déterminer la nature de l'interaction entre les deux partenaires et aussi, par voie de conséquence, la réussite ou non de l'infection ou de l'invasion.

2.1 Colonisation de l'apoplaste

2.1.1 Bactéries phytopathogènes associées à l'apoplaste : les bactéries non-vasculaires

À l'exception des bactéries véhiculées directement dans les vaisseaux de la plante hôte par un insecte vecteur, l'apoplaste représente un passage obligé pour les bactéries phytopathogènes. Certaines espèces comme *P. syringae* pv. *tomato* et *X. campestris* pv. *euvesicatoria* se multiplient essentiellement et localement dans l'apoplaste. Elles sont alors appelées bactéries **non-vasculaires** ou **bactéries apoplastiques** (Tableau 1). En revanche, d'autres bactéries comme *X. campestris* pv. *campestris* et *X. oryzae* pv. *oryzae* ne sont pas limitées à l'apoplaste et empruntent celui-ci pour envahir par la suite le xylème.

2.1.2 L'apoplaste : caractéristiques et constituants

2.1.2.1 Caractéristiques et disponibilité en nutriments

Chez les plantes, les communications cellule-milieu ou cellule-cellule sont réalisées par deux voies différentes : la voie symplastique et la voie apoplastique. Le symplaste est constitué par l'ensemble des cytoplasmes cellulaires qui communiquent entre eux grâce aux perforations présentes au niveau des parois cellulaires appelées plasmodesmes. Par opposition au symplaste, l'apoplaste est constitué par l'ensemble des espaces extracellulaires qui

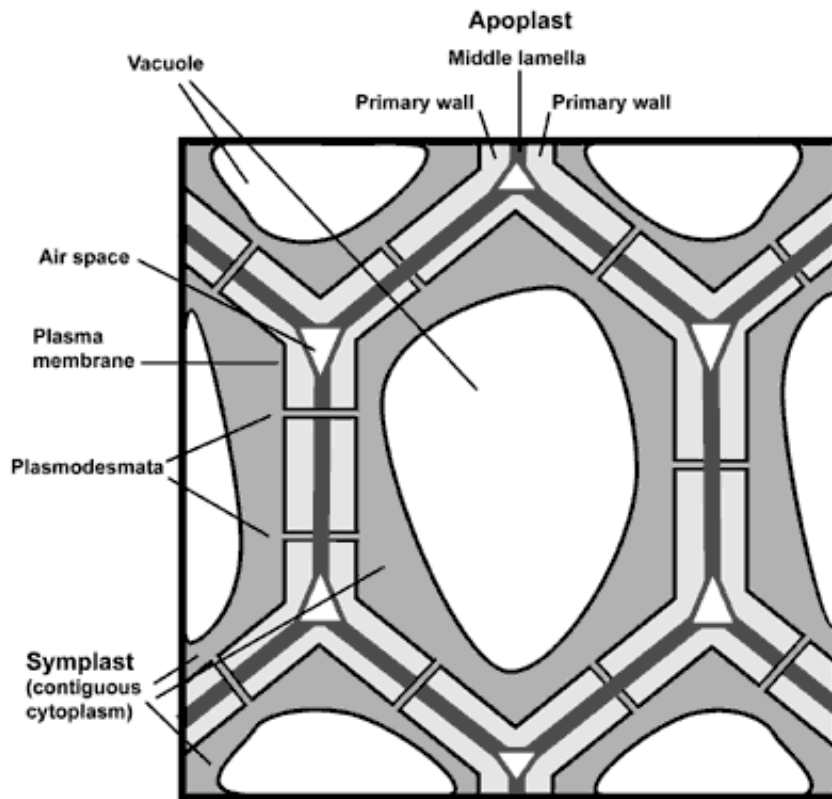


Figure 17. Représentation schématique d'une cellule végétale. L'apoplaste est constitué par les espaces extracellulaires qui délimitent les membranes plasmiques, tandis que le symplaste est formé par les espaces cytoplasmiques qui communiquent *via* les plasmodesmes (<http://www.ccruc.uga.edu>).

Tableau 2. Concentration en mM de métabolites et d'ions présents dans l'apoplaste de trois espèces végétales : le maïs (*Zea mays*), le ricin (*Ricinus communis*) et l'orge (*Hordeum vulgare*) (d'après Lohaus, 2007).

	<i>Zea mays</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
K⁺	7.7	13.7	16.0
Na⁺	0.8	0.6	2.6
Cl⁻	2.3	1.1	3.8
NO₃⁻	1.6	0.3	6.5
Σ Amino acids	1.5	1.9	2.6
Sucrose	1.6	1.3	2.7

délimitent les membranes plasmiques et le xylème. Cet espace intercellulaire comprend majoritairement la paroi cellulaire, le fluide apoplastique et les gaz qui sont en général véhiculés par les méats ou les espaces intercellulaires (Figure 17) (Sakurai, 1998 ; Sattelmacher, 2001). Au niveau du mésophylle foliaire, de nombreux espaces intercellulaires peuvent former un réseau connu sous l'appellation parenchyme lacuneux ou aérifère qui permet les échanges gazeux avec l'atmosphère *via* les stomates. Cet espace aérifère est beaucoup plus développé chez les plantes en C3 que chez les plantes en C4 (50% *versus* 20% du volume foliaire) (Lohaus, 2007; Sattelmacher, 2001). L'apoplaste des plantes en C4 (notamment la canne à sucre) est divisé en deux compartiments qui sont séparés l'un de l'autre par les parois subérifiées et lignifiées du sclérenchyme (seule l'eau peut diffuser à travers cette paroi) et qui possèdent des caractéristiques ioniques et organiques différentes (Dong *et al.*, 1997). Le premier compartiment est associé aux faisceaux vasculaires et ne contient pas de sucrose, tandis que le deuxième compartiment est associé aux cellules du parenchyme non vasculaire (Dong *et al.*, 1997 ; Sattelmacher, 2001 ; Welbaum *et al.*, 1992).

Par analogie à l'environnement interne du corps humain, l'apoplaste est considéré comme l'environnement physiologique interne de la plante (Sakurai, 1998). En plus du transport de l'eau, des ions et de molécules organiques, l'apoplaste véhicule également des oligosaccharides, des hormones (telles que l'auxine, la cytokinine et l'acide abscissique) et des protéines (entre autres des protéines de défense) (Sakurai, 1998). Par ailleurs, l'apoplaste assure d'autres fonctions dont la régulation de l'homéostasie et de la croissance de la plante, l'acheminement des sucres vers les tissus conducteurs, la signalisation intercellulaire ainsi que la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Felle *et al.*, 2005 ; Hoson, 1998 ; Lohaus, 2007).

Après leur passage par les ouvertures naturelles ou les blessures au niveau des feuilles, les bactéries phytopathogènes vont rencontrer l'apoplaste, un environnement qui est différent de celui de la phyllosphère. L'apoplaste constitue un environnement très dynamique dans lequel plusieurs processus métaboliques et de transport ont lieu. La composition et la concentration des nutriments dans le fluide apoplastique varient considérablement en fonction de l'espèce végétale, l'âge et l'horloge circadienne de la plante, mais aussi en réponse à des signaux de l'environnement (Tableau 2) (Hoson, 1998 ; Lohaus, 2007). Une fois dans l'apoplaste, les bactéries phytopathogènes se multiplient dans le fluide apoplastique qui constitue un milieu acide (pH 4,5-6 en fonction des espèces végétales) (Grignon et Sentenac, 1991 ; Sakurai, 1998). Les nutriments présents dans l'apoplaste sont vraisemblablement suffisants pour la multiplication de microorganismes comme les bactéries phytopathogènes

(Rico et Preston, 2008 ; Rudolph, 1993 ; Solomon *et al.*, 2003). En effet, l'apoplaste est un réservoir de sels minéraux (en particulier le potassium K^+) et il contient également des acides organiques, des acides aminés (2-10 mM) et des ions (essentiellement chlorure et nitrate) (Tableau 2) (Lohaus, 2007 ; Sakurai, 1998 ; Sattelmacher, 2001).

2.1.2.2 Exemples de mécanismes de défense exprimés dans l'apoplaste

La paroi cellulaire, un des constituants majeurs de l'apoplaste, constitue le premier obstacle physique rencontré par les bactéries lors de l'invasion de l'apoplaste. La détection de l'agent pathogène par la plante résulte en le remodelage de la paroi végétale et en l'empoisonnement de l'apoplaste par des composés antimicrobiens (Doehlemann et Hemetsberger, 2013 ; Monaghan et Zipfel, 2012). La première réaction de défense mise en place au niveau de l'apoplaste est la génération excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'aide de peroxydases de la paroi végétale (Daudi *et al.*, 2012 ; Delannoy *et al.*, 2003 ; Martinez *et al.*, 1998). A forte doses, les ROS sont toxiques et peuvent endommager les cellules bactériennes par oxydation des lipides et des acides nucléiques. Suite à une infection du coton par *X. axonopodis* pv. *malvacearum* et du riz par *X. oryzae* pv. *oryzae*, une accumulation de peroxydases est observée au niveau de l'apoplaste et du xylème (Delannoy *et al.*, 2003 ; Martinez *et al.*, 1998 ; Young *et al.*, 1995). Cette accumulation de peroxydases est également associée à un renforcement pariétal (formation de papilles et dépôt de lignine) au niveau des cellules du mésophylle et du xylème (Brown *et al.*, 1993 ; Luna *et al.*, 2010 ; Young *et al.*, 1995). Cette réaction permet à la plante de mieux résister aux agents pathogènes.

Les protéines de défense, en particulier les protéines PR telles que les chitinases, les thionines, les peroxydases et les protéases sont également retrouvées au niveau de l'apoplaste. Ces protéines peuvent avoir des activités antimicrobiennes diverses (Sakurai, 1998 ; Doehlemann et Hemetsberger, 2013). À titre d'exemple, deux chitinases extracellulaires isolées à partir de l'apoplaste des feuilles de tabac et exprimées lors de la résistance basale sont supposées dégrader la paroi cellulaire de certains *Pseudomonas* et donc affecter leur intégrité (Ott *et al.*, 2006). Par ailleurs, la cathepsin B, une protéase nécessaire pour l'induction de la réaction hypersensible (HR) et de la résistance non-hôte chez le tabac suite à l'infection par *E. amylovora* et *P. syringae*, est activée une fois sécrétée au niveau de l'apoplaste (Gilroy *et al.*, 2007). Dans l'apoplaste, on trouve aussi d'autres métabolites

Tableau 3. Exemples de bactéries phytopathogènes qui colonisent le xylème (bactéries vasculaires).

Groupe	Espèce bactérienne	Maladie provoquée/Insecte vecteur, le cas échéant	Référence
Gram - β-protéobactéries	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bactérie polyphage - Flétrissement bactérien de la tomate (« bacterial wilt of tomato ») - Pourriture brune de la pomme de terre (« brown rot of potato »)	1
	<i>Ralstonia syzygii</i>	Maladie de Sumatra du giroflier/Insecte vecteur (<i>Cercopoidea</i>)	2
	<i>Xanthomonas albilineans</i>	Échaudure des feuilles de la canne à sucre « leaf scald of sugarcane »)	3
	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Flétrissement bactérien du riz (« bacterial blight of rice »)	4
Gram - γ-protéobactéries	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Nervation noire des crucifères (« black rot of crucifers »)	5
	<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>musacearum</i>	Flétrissement bactérien du bananier (« bacterial wilt of banana »)	6
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	Bactériose vasculaire du manioc (« cassava bacterial blight »)	7
	<i>Xyllela fastidiosa</i>	Bactérie polyphage/Insecte vecteur (<i>Cicadellidae</i> et <i>Cercopoidea</i>) - Chlorose variée des agrumes (« citrus variegated chlorosis ») - Maladie de Pierce de la vigne (« Pierce's disease of grapevine »)	8
	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	Flétrissement de Stewart du maïs (« Stewart's wilt of corn »)/Insecte vecteur (Coléoptère)	9
	<i>Dickeya dadantii</i> (= <i>Erwinia chrysanthemi</i>)	Bactérie polyphage: Pourriture molle et jambe noire de la pomme de terre (« soft rot and blackleg of potato »)	10
	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	Rabougrissement des repousses de la canne à sucre (« ratoon stunting of sugarcane »)	2
Gram + Actinobactéries	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Flétrissement et chancre bactérien de la tomate (« bacterial wilt and canker of tomato »)	11

1 : Vasse *et al.*, 1995 ; **2** : Purcell et Hopkins, 1996; **3**: Birch, 2001; **4**: Nino-Liu *et al.*, 2006; **5**: Meyer *et al.*, 2005 ; **6** : Ryan *et al.*, 2011 ; **7** : Boher *et al.*, 1995 ; **8** : Alves *et al.*, 2004, Chatterjee *et al.*, 2008a ; **9** : Roper, 2011 ; **10** : Czajkowski *et al.*, 2010 ; **11** : Chalupowicz *et al.*, 2012.

Tableau 4. Exemples de bactéries phytopathogènes intracellulaires du phloème (bactéries vasculaires).

Groupe	Espèce bactérienne	Maladie provoquée	Référence
Gram - α, γ-protéobactéries	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	Maladie du dragon jaune des agrumes (« huanglongbing » ou « citrus greening »)	1
	<i>Candidatus Phlomobacter fragariae</i>	Chlorose marginale du fraisier (« marginal chlorosis of strawberry »)	2
	<i>Serratia marcescens</i>	Maladie du “Cucurbit yellow vine”	3
	<i>Spiroplasma citri</i>	Maladie du Stubborn des agrumes	4
Gram + Mollicutes	<i>Spiroplasma kunkelii</i>	Rabougrissement du maïs (« corn stunt »)	5
	<i>Spiroplasma phoeniceum</i>	Rabougrissement de la pervenche (« periwinkle stunt »)	
	<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>	Jaunisse de l’aster (« aster yellows »)	
	<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>	Bois noir de la vigne (« Stolbur »)	
	<i>Candidatus Phytoplasma aurantifolia</i>	Maladie du balai de sorcière du limettier (« witches’broom of lime »)	

Remarque : Les espèces bactériennes intracellulaires du phloème, notamment celles décrites dans ce tableau, sont toutes véhiculées dans le phloème par des insectes vecteurs.

1 : Kim *et al.*, 2009c ; 2 : Danet *et al.*, 2003 ; 3: Bruton *et al.*, 2003; 4: Bové et Granier, 2002; 5: Hogenhout, 2008.

secondaires (saponines, glycosides, glucosinolates, acides cinnamiques) qui sont associés à une fonction antifongique et antimicrobienne (Rico *et al.*, 2009).

2.2 Colonisation des tissus vasculaires

2.2.1 Bactéries phytopathogènes associées aux tissus vasculaires : les bactéries vasculaires

Les bactéries qui sont capables de se multiplier dans les faisceaux vasculaires de la plante sont appelées les bactéries vasculaires (Tableaux 3 et 4). La pénétration des bactéries dans le xylème peut avoir lieu grâce aux hydathodes (ouvertures naturelles directement reliées au xylème), comme c'est le cas pour *X. campestris* et *X. oryzae* pv. *oryzae*, ou par un mécanisme actif suite à la dissolution des parois cellulaires et de la lamelle moyenne comme c'est le cas chez *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Boher *et al.*, 1995 et 1996). D'autres bactéries phytopathogènes telles que *Xylella fastidiosa* et les phytoplasmes sont véhiculées directement dans les vaisseaux de la plante par leur insecte vecteur. Étant donnée leur localisation vasculaire (xylème ou phloème), ces bactéries se multiplient puis se propagent de manière systémique dans la plante en envahissant rapidement d'autres organes que le site d'infection. Parmi les bactéries très bien adaptées au xylème, on peut citer l'agent causal du flétrissement bactérien des Solanacées, *R. solanacearum*, dont les densités bactériennes dans le xylème de la tomate peuvent atteindre 10^8 à 10^9 cfu/g de tige (Jacobs *et al.*, 2012).

Si la majorité des bactéries phytopathogènes vasculaires se multiplient d'abord dans l'apoplaste foliaire ou rhizosphérique avant de coloniser le xylème, *Xylella fastidiosa*, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* et *Ralstonia syzygii* se multiplient quant à elles exclusivement dans le xylème de la plante hôte. C'est pourquoi ces bactéries sont nommées « Fastidious Xylem-Limited Bacteria » ou XLB. À l'exception de *L. xyli* subsp. *xyli*, *Xylella fastidiosa* et *R. syzygii* sont véhiculées dans le xylème par leur insecte vecteur. Par ailleurs, la multiplication des phytoplasmes (bactéries phytopathogènes dépourvues de paroi cellulaire et appartenant à la classe des Mollicutes) et d'autres protéobactéries est aussi strictement limitée aux cellules du phloème (Bové et Garnier, 2002 ; Purcell et Hopkins, 1996) (Tableau 4). Ces bactéries vivent dans les tubes criblés du phloème et sont par conséquent intracellulaires (Bové et Garnier, 2002 ; Christensen *et al.*, 2005).

À l'exception des spiroplasmes, les bactéries associées au phloème ne sont pas cultivables *in vitro* sur milieu de culture. Ce résultat est très probablement lié au fait que la

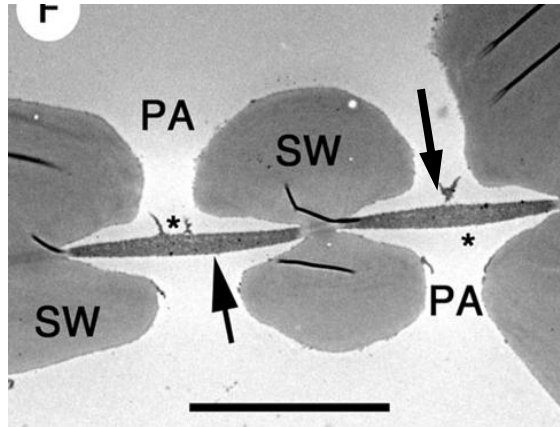


Figure 18. Ponctuations ou « Pits » (flèches) présentes au niveau de la paroi du xylème de *Lindera megaphylla* (d'après Nardini *et al.*, 2011). Les ponctuations sont dépourvues de la paroi secondaire (SW). PA: pit aperture, *: pit chamber.

Tableau 5. Concentration en mM de métabolites et d'ions présents dans l'apoplaste, dans le xylème et dans le phloème du maïs (*Zea mays*) (d'après Lohaus, 2007).

	Apoplast	Xylem	Phloem
K⁺	7.7	6.4	57
Na⁺	1.0	0.2	0.7
Cl⁻	2.3	1.0	8.7
NO₃⁻	1.3	4.4	n.d.
Σ Amino acids	1.3	2.0	59
Sucrose	2.6	0.2	822

sève phloémienne est riche en nutriments dont certains, indispensables pour la multiplication des bactéries, sont encore inconnus (Bové et Garnier, 2002).

2.2.2 Les faisceaux vasculaires : caractéristiques, disponibilité en nutriments et autres composés

2.2.2.1 Caractéristiques et constituants

Les tissus conducteurs de la plante sont le xylème et le phloème. Ils communiquent entre eux par des échanges latéraux, ce qui permet l'ajustement des besoins en eau et la coordination du flux de sève. Ces deux tissus possèdent des caractéristiques et des fonctions différentes. Le xylème achemine la sève brute (eau chargée d'ions minéraux) depuis les racines vers les parties aériennes de la plante. Le phloème quant à lui, assure l'acheminement de la sève élaborée (sucres produits au cours de la photosynthèse) depuis les organes synthétiques (les feuilles) vers les organes non synthétiques (la tige, les racines).

Le xylème est constitué par de vaisseaux morts à paroi lignifié : les trachéides et les éléments de vaisseaux (Vallade, 2001). Les trachéides conservent leurs parois terminales ; elles ne communiquent donc entre elles que par des ponctuations (zones dépourvues de paroi secondaire et appelées « pits » en anglais) sur les faces terminales et latérales (Figure 18). Les éléments de vaisseaux résorbent partiellement ou totalement leurs parois terminales et la communication entre deux éléments successifs s'effectue donc par des perforations. Ces perforations permettent le passage longitudinal et continu de la sève brute et peuvent aussi permettre le passage des bactéries, ce qui conduit à un envahissement systémique de la plante (Bové et Garnier, 2002). Les éléments de vaisseaux, les trachéides et les cellules du parenchyme vasculaire communiquent entre eux latéralement *via* les ponctuations. Chez les angiospermes, le diamètre de ces ponctuations varie entre 5 et 20 nm (Choat *et al.*, 2003). Ces ponctuations constituent par conséquent une barrière physique face aux agents pathogènes vasculaires, notamment les bactéries. A titre d'exemple, *Xyllela fastidiosa* forme des bâtonnets de 0.25–0.5 µm de diamètre (Mollenhauer et Hopkins, 1974).

Les principaux éléments conducteurs du phloème sont les tubes criblés qui sont formés de cellules vivantes, mais qui deviennent anucléées à maturité. Ces tubes criblés sont associés à des cellules compagnes nommées aussi cellules de transfert car, au travers de plasmodesmes (communication symplastique), elles permettent de charger les tubes criblés en sève. Les plasmodesmes sont suffisamment larges pour permettre le passage de microorganismes tels

Tableau 6. Composés de la sève phloémienne potentiellement associés à la résistance des plantes ou à l’initiation des réactions de défense (signalisation) (d’après van Bel et Gaupels, 2004).

Signalling compounds	Function in resistance or defence
Salicylic acid	Essential for SAR—role of SA as systemic signal disputed
Jasmonic acid	Signal in pathogen defence/resistance—putative systemic signal in wound response
Antioxidant defence system	ROI producing/degrading enzymes and antioxidants are involved in HR and SAR
Thioredoxin, glutaredoxin	Redox regulation—targeting and activation of proteins
Calcium	Involved in oxidative burst and HR
Oligosaccharides	Regulation of <i>PR</i> genes and SA synthesis
mRNA	
— <i>WRKY</i>	Encodes for a transcription factor of <i>PR</i> genes
Peptides	
—DIR1	Lipid transport protein essential for SAR
—kinases	(Ca ²⁺ -dependent) protein kinases
—lipoxygenase	Involved in jasmonic acid signalling
—systemin	Induction of defence genes upon wounding

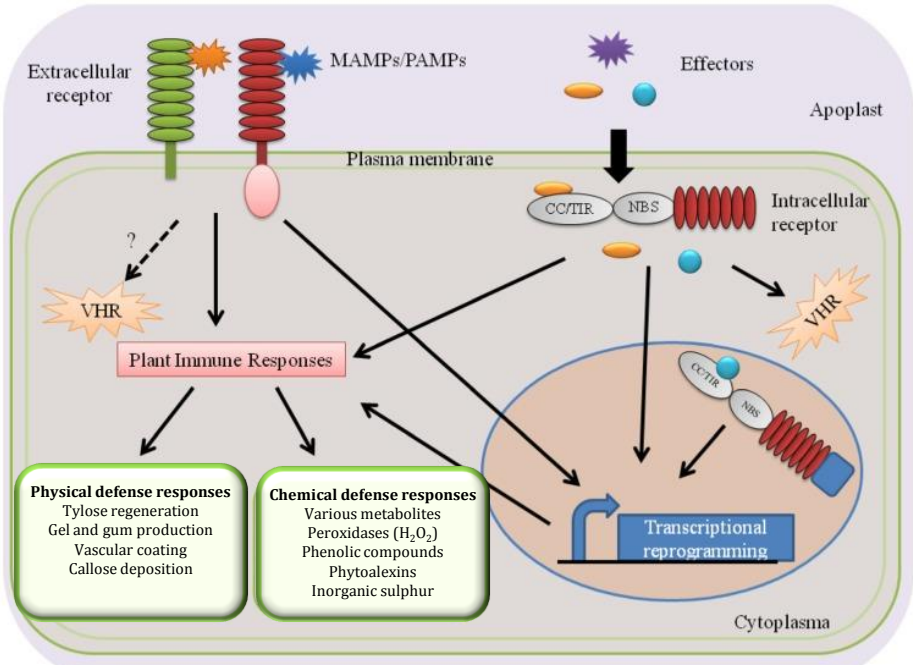


Figure 19. Perception des agents pathogènes vasculaires et mécanismes de défense mis en place par les plantes (d’après Yadeta et Thomma, 2013). Les plantes détectent les MAMPs ou les effecteurs sécrétés par les bactéries phytopathogènes *via* des récepteurs membranaires (XA21 chez le riz qui détecte Ax21, un MAMP de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) ou intracellulaires (la protéine RRS1-R de type NB-LRR chez *Arabidopsis* détecte l’effecteur PopP2 sécrété par *Ralstonia solanacearum*). La détection des agents pathogènes est suivie par le déclenchement des réactions de défense. Parmi les principales réponses immunitaires, on distingue les défenses physiques (ex. dépôt de callose) et les défenses chimiques (ex. accumulation de phytoalexines). Ces processus ont probablement lieu dans les cellules du parenchyme vasculaire.

les virus et les bactéries. Ils peuvent en effet atteindre jusqu'à 15 µm de diamètre (Bové et Garnier, 2002 ; Dinant, 2008).

La sève phloémienne, qui est légèrement alcaline (pH 7,5-8,5), est beaucoup plus riche en nutriments que le xylème et l'apoplaste (Tableau 5) (Dinant, 2008 ; Lohaus, 2007). La concentration en saccharose de la sève élaborée peut atteindre 0,5 à 1 M en fonction des espèces végétales. La sève phloémienne contient également des concentrations élevées en acides aminés (50-200 mM), acides organiques et amides, sels minéraux (K^+), et en ions (Ca^{2+}). La plupart des hormones est retrouvée dans la sève phloémienne, notamment l'auxine, la cytokinine, l'acide abscissique, la gibbérelline et l'éthylène (Hoad, 1995).

Contrairement aux bactéries associées au phloème, les bactéries xylémiques se développent dans un milieu pauvre en nutriments. En effet, la sève xylémienne contient des composés organiques et inorganiques, mais leur concentration est extrêmement faible (Tableau 5). A titre d'exemple, la concentration de saccharose est seulement de 0,2 mM chez le maïs, et elle est presque nulle chez la canne à sucre (Lohaus, 2007 ; Welbaum *et al.*, 1992).

2.2.2.2 Exemples de mécanismes de défense exprimés dans les tissus vasculaires

Une fois l'agent pathogène reconnu par la plante, les deux tissus conducteurs déclenchent une batterie de réactions de défense. Le rôle du phloème dans l'initiation des réactions de défense et la transduction du signal est bien documenté (van Bel et Gaupels, 2004). La sève phloémienne contient plusieurs molécules « signal » essentielles dans la voie de signalisation (Tableau 6), notamment l'acide salicylique et l'acide jasmonique, ainsi que les espèces réactives de l'oxygène (Rocher *et al.*, 2006). Des protéines de défense PR sont également retrouvées dans le phloème (Aki *et al.*, 2008).

Au niveau du xylème, les bactéries vasculaires doivent d'abord faire face aux défenses préformées de la plante que sont les barrières physiques (principalement la paroi végétale) et les barrières chimiques (dont les phytoanticipines) (Figure 19) (Yadeta et Thomma, 2013). La formation de tyloses au niveau des vaisseaux du xylème est un des mécanismes de défense les plus répandus chez les plantes pour freiner une invasion microbienne (Grimault *et al.*, 1994 ; Rahman *et al.*, 1999). Les tyloses sont souvent associées à une substance gommeuse formée de pectine dont le rôle est d'obstruer complètement les vaisseaux envahis afin de limiter le passage des bactéries aux vaisseaux adjacents (Fry et Milholland, 1990 ; Rahman *et al.*, 1999). La formation des tyloses est plus rapide et plus étendue chez les plantes hôtes

résistantes que chez les plantes hôtes sensibles, ce qui montre leur implication dans la résistance (Grimault *et al.*, 1994 ; Fry et Milholland, 1990).

D'autres barrières structurales, comme l'épaississement des parois et le dépôt de callose peuvent également être observés au niveau du xylème suite à une infection bactérienne (Rahman *et al.*, 1999). De plus, suite à une infection, plusieurs métabolites secondaires et des protéines impliquées dans la défense s'accumulent dans le xylème (Yadeta et Thomma, 2013). Parmi les métabolites secondaires produits par les plantes, on trouve des composés phénoliques tels que la lignine, les tanins, les saponines, les flavonoïdes et les glucosinolates (Fontaniella *et al.*, 2007 ; Wallis et Chen, 2012). Ces phytoalexines ont un effet antimicrobien et antifongique, et elles ont par conséquent aussi un rôle majeur dans la résistance des plantes. Plusieurs protéines PR sont également retrouvées dans le xylème et leur rôle est d'inhiber directement ou indirectement le développement des agents pathogènes (Aki *et al.*, 2008 ; Buhtz *et al.*, 2004). Ces protéines sont impliqués dans la résistance des plantes aux agents pathogènes et certaines d'entre-elles sont présentes uniquement dans la sève xylémienne des variétés tolérantes. Elles sont absentes de la sève des variétés sensibles, comme c'est le cas pour la vigne en réponse aux attaques de *Xyllela fastidiosa* (Basha *et al.*, 2010). Lors d'une réaction incompatible entre *X. oryzae* pv. *oryzae* et le riz, on observe une augmentation de l'activité des peroxydases dans les faisceaux du xylème (Hilaire *et al.*, 2001). Mise à part la production des espèces réactives de l'oxygène, l'augmentation de l'activité de peroxydases induit aussi une polymérisation des composés de la paroi végétale et, par voie de conséquence, une lignification et une subérification de ces derniers (Hilaire *et al.*, 2001 ; Passardi *et al.*, 2005).

2.3 Stratégies déployées par les bactéries pour coloniser les tissus de la plante

Contrairement aux bactéries épiphytes qui doivent essentiellement faire face à des conditions environnementales constamment variables, les bactéries phytopathogènes endophytes sont plutôt sujettes à une panoplie de mécanismes de défense complexes, variés et parfois efficaces pour stopper la maladie. Toutefois, au cours de leur évolution, les bactéries phytopathogènes ont à leur tour développé des stratégies sophistiquées pour contourner ou échapper à ces systèmes de défense, ce qui leur permet *in fine* de se multiplier et de tirer profit du menu exceptionnel qu'offre la cellule végétale (Abramovitch *et al.*, 2006). Comme on vient de le voir dans le paragraphe précédent, et contrairement aux bactéries pathogènes de

Pseudomonas syringae pv. *tomato*

Pectobacterium atrosepticum
(*E. carotovora* subsp. *atroseptica*)

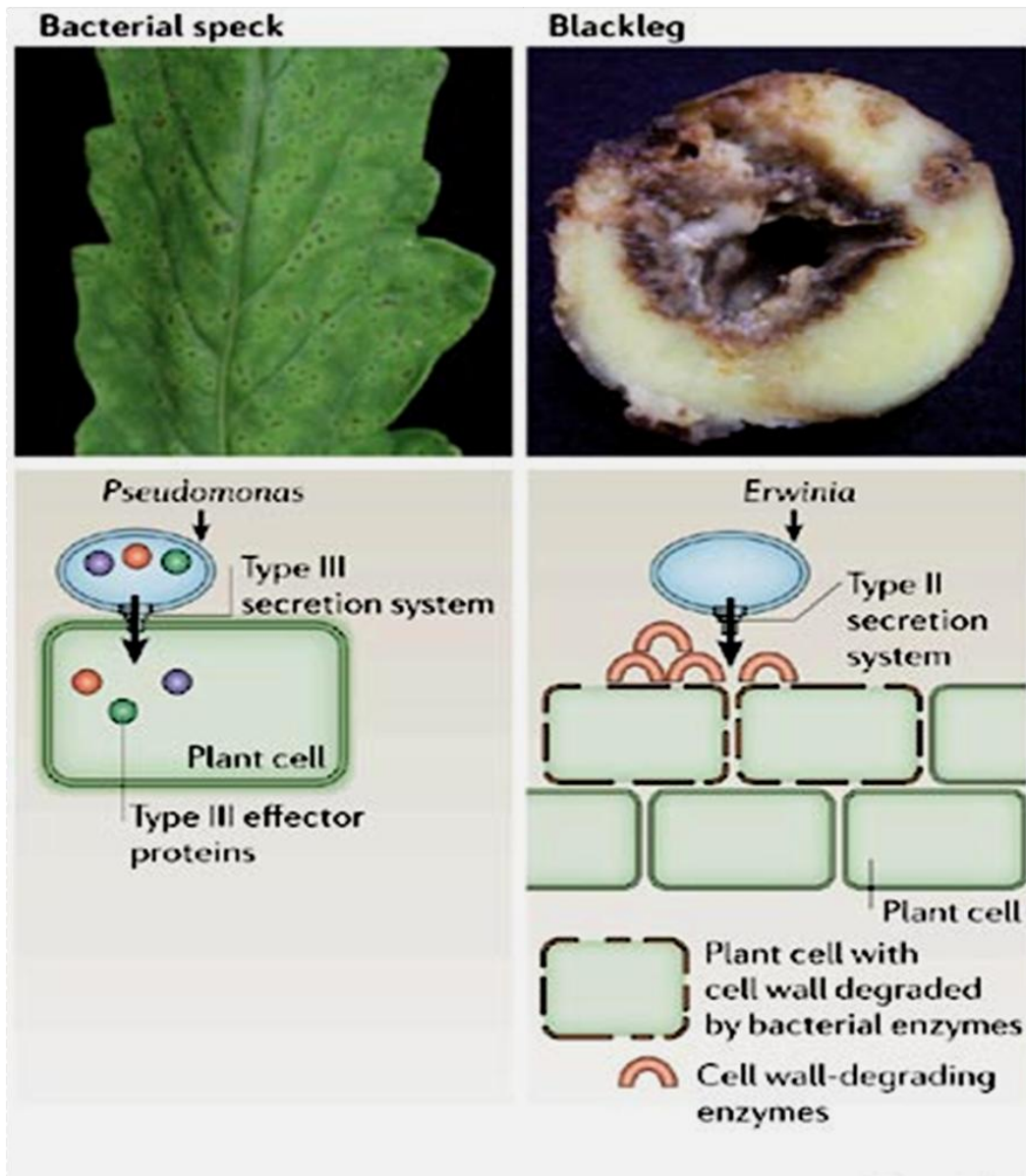


Figure 20. Stratégies majeures utilisées par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* pour coloniser leur plante hôte (d'après Abramovitch et al., 2006). *P. syringae* pv. *tomato* utilise le SST3 Hrp pour injecter une panoplie d'effecteurs directement dans la cellule végétale, alors qu'*E. carotovora* subsp. *atroseptica* dépend plutôt du SST2 qui lui permet de sécréter une multitude d'enzymes de dégradation de la paroi végétale.

l'homme et des mammifères qui sont intracellulaires, les bactéries pathogènes des plantes (à l'exception des phytoplasmes) sont extracellulaires et se développent dans l'apoplaste ou dans le xylème. Ces tissus, en particulier le xylème, ne présentent pas forcément des conditions optimales pour la multiplication des bactéries.

Pour subvenir à leur besoin, les bactéries phytopathogènes tirent profit de la cellule végétale en utilisant principalement deux stratégies différentes (Figure 20). Ces stratégies reposent essentiellement sur les caractéristiques génomiques de ces agents pathogènes. Les stratégies employées pour coloniser la plante hôte et pour acquérir les nutriments ont été utilisées pour classer les bactéries phytopathogènes en deux groupes : les "**stealth pathogens**" (agents pathogènes furtifs) et les "**brute force pathogens**" (agents pathogènes de force brute) (Alfano et Collmer, 1996 ; Collmer *et al.*, 2009 ; Davidsson *et al.*, 2013 ; Rico *et al.*, 2009). La première stratégie ou "stealth strategy" concerne les bactéries dont la pathogénie repose essentiellement sur le SST3 Hrp et ses effecteurs. Des exemples classiques de ce type de bactéries sont les *Xanthomonas* spp., les pathovars de *P. syringae* et *R. solanacearum*. Les effecteurs sécrétés par le SST3 permettent en effet à ces agents pathogènes de moduler la physiologie de la cellule végétale et notamment les réactions de défense, ce qui leur permet d'acquérir les nutriments à partir de cellules vivantes et de se multiplier dans les tissus de leur hôte à des densités assez élevées sans provoquer de dommages. Ce n'est qu'au stade ultime de l'infection que ces bactéries provoquent la mort cellulaire qui se traduit par l'apparition de symptômes de nécrose. Par analogie aux champignons, ces bactéries ont été considérées comme des hémibiotrophes.

Si le SST3 Hrp a un rôle central chez les "stealth pathogens", son importance est moindre dans la pathogénie des "brute force pathogens". Les "brute force pathogens" possèdent en effet un large arsenal enzymatique de dégradation de la paroi végétale ou Plant Cell Wall Degrading Enzymes (PCWDE). Ces PCWDE sont les principaux acteurs du pouvoir pathogène des entérobactéries responsables des pourritures molles (*D. dadantii* et *Pectobacterium* spp.). Ces enzymes induisent depuis les stades précoces de l'infection une macération accrue des tissus, et ces bactéries se nourrissent donc à partir de cellules mortes (Charkowski *et al.*, 2012 ; Toth *et al.*, 2003). Ces bactéries sont donc considérées comme des nécrotrophes. Les "stealth pathogens" et les "brute force pathogens" utilisent clairement des stratégies de virulence assez distinctes qui reflètent des modes d'infection de la plante hôte très différents.

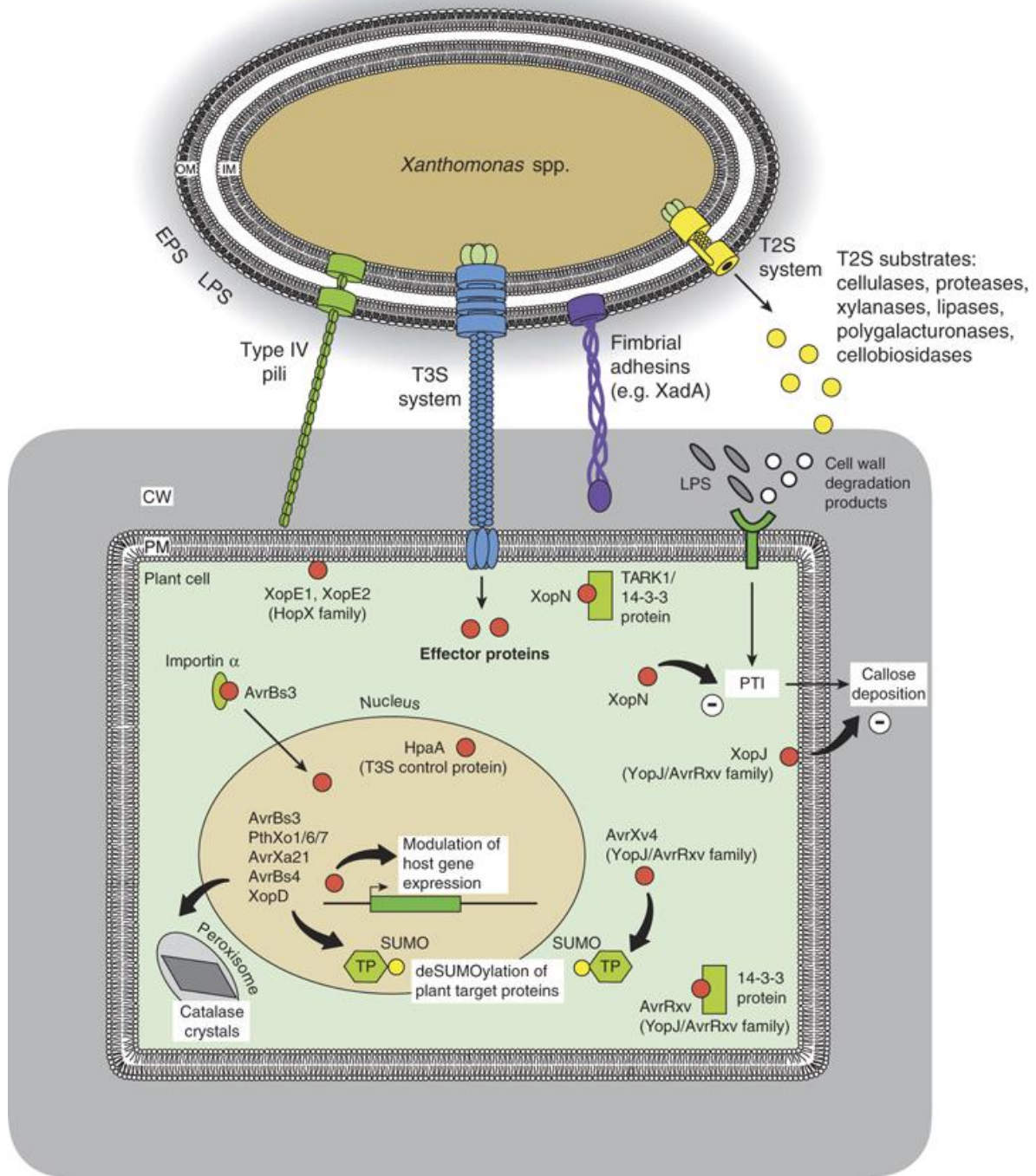


Figure 21. Représentation schématique des principaux facteurs de virulence des *Xanthomonas* spp. (d'après Büttner et Bonas, 2009). Afin de coloniser la plante hôte, les *Xanthomonas* spp. dépendent essentiellement des systèmes de sécrétion de type 2 (SST2) et de type 3 (SST3), des adhésines, de la production d'exopolysaccharides (EPS) et de lipopolysaccharides (LPS). Les LPS, ainsi que d'autres PAMP, élicitent les défenses basales de la plante ou PAMP-Triggered Immunity (PTI). La PTI peut aussi être déclenchée par les fragments pariétaux libérés par l'action des enzymes de dégradation de la paroi. Le SST3 permet la translocation de protéines effectrices directement dans le cytosol de la cellule eucaryote et il est essentiel pour la pathogénie de ces bactéries. Ces effecteurs suppriment la PTI. L'effecteur XopN interagit avec les protéines TARK1 et 14-3-3 et supprime la PTI, ce qui permet la multiplication des bactéries et le développement des symptômes de la maladie. Les effecteurs appartenant à la famille d'AvrBs3/PthA modulent l'expression des gènes de la plante. XopD (effecteur de la famille cystéine protéase) ainsi que les effecteurs appartenant à la famille AvrRxv/YopJ déstabilisent la désumoylation des protéines végétales associées aux protéines SUMO ou inhibent le dépôt de callose, comme c'est le cas pour XopJ. CW: paroi végétale; PM: membrane plasmique.

Par ailleurs, les pathovars de certaines espèces bactériennes (comme chez les *Xanthomonas* spp.) se caractérisent non seulement par une spécificité d'hôte, mais aussi par une spécificité tissulaire ; ces derniers se multiplient en effet soit dans le xylème (ex. *X. oryzae* pv. *oryzae*) d'où une colonisation systémique de la plante, soit ils restent localisés au niveau des espaces intercellulaires du mésophylle foliaire (ex. *X. oryzae* pv. *oryzicola*) (Büttner et Bonas, 2009). Malgré l'identification de plusieurs candidats, les déterminants génétiques de la spécificité tissulaire qui permettent à une espèce bactérienne de coloniser un tissu et non l'autre ne sont pas encore déterminés à ce jour. Plusieurs analyses de génomique comparative ont été réalisées entre des souches de *Xanthomonas* appartenant à des espèces et des pathovars différents, et ayant des spécificités d'hôte et tissulaire différentes (Bogdanove *et al.*, 2011 ; da Silva *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2008). D'après ces analyses, la spécificité tissulaire n'est pas liée à des modifications majeures dans le contenu des gènes, mais elle est associée à des modifications minimales (de l'ordre d'un acide aminé) dans un très faible nombre de gènes, dans des régions non codantes, ou à des différences à l'extérieur des clusters de pathogénie (Bogdanove *et al.*, 2011 ; Lu *et al.*, 2008).

De plus, qu'elles soient vasculaires ou non-vasculaires, les bactéries phytopathogènes utilisent en général le même arsenal de facteurs de virulence pour coloniser leur plante hôte. En effet, les "stealth pathogens" et les "brute forces pathogens", même si leurs modes d'infection sont assez différents, possèdent les mêmes déterminants moléculaires. Le degré d'implication de ces derniers dans le pouvoir pathogène n'est cependant pas identique (Figures 21 et 22). Les principaux mécanismes mis en place par les bactéries phytopathogènes pour coloniser leur plante hôte sont présentés ci-dessous.

2.3.1 Chimiotactisme et mobilité : mécanismes préliminaires à la colonisation de la plante hôte

Afin de coloniser et de s'adapter spécifiquement à la plante hôte, les bactéries phytopathogènes commencent d'abord par percevoir et reconnaître des molécules spécifiques d'origine végétale. Le chimiotactisme est un mécanisme qui permet aux bactéries de reconnaître leur plante hôte et de réagir efficacement aux changements de l'environnement. Les bactéries phytopathogènes, et notamment les *Xanthomonas*, les *Erwinia*, *P. syringae* et *R. solanacearum*, possèdent des senseurs (appelés Methyl-accepting Chemotaxis Proteins) qui leur permettent de détecter spécifiquement les stimuli environnementaux (Buell *et al.*, 2003 ; Charkowski *et al.*, 2012 ; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011a ; Yao et Allen, 2006). Suite à la

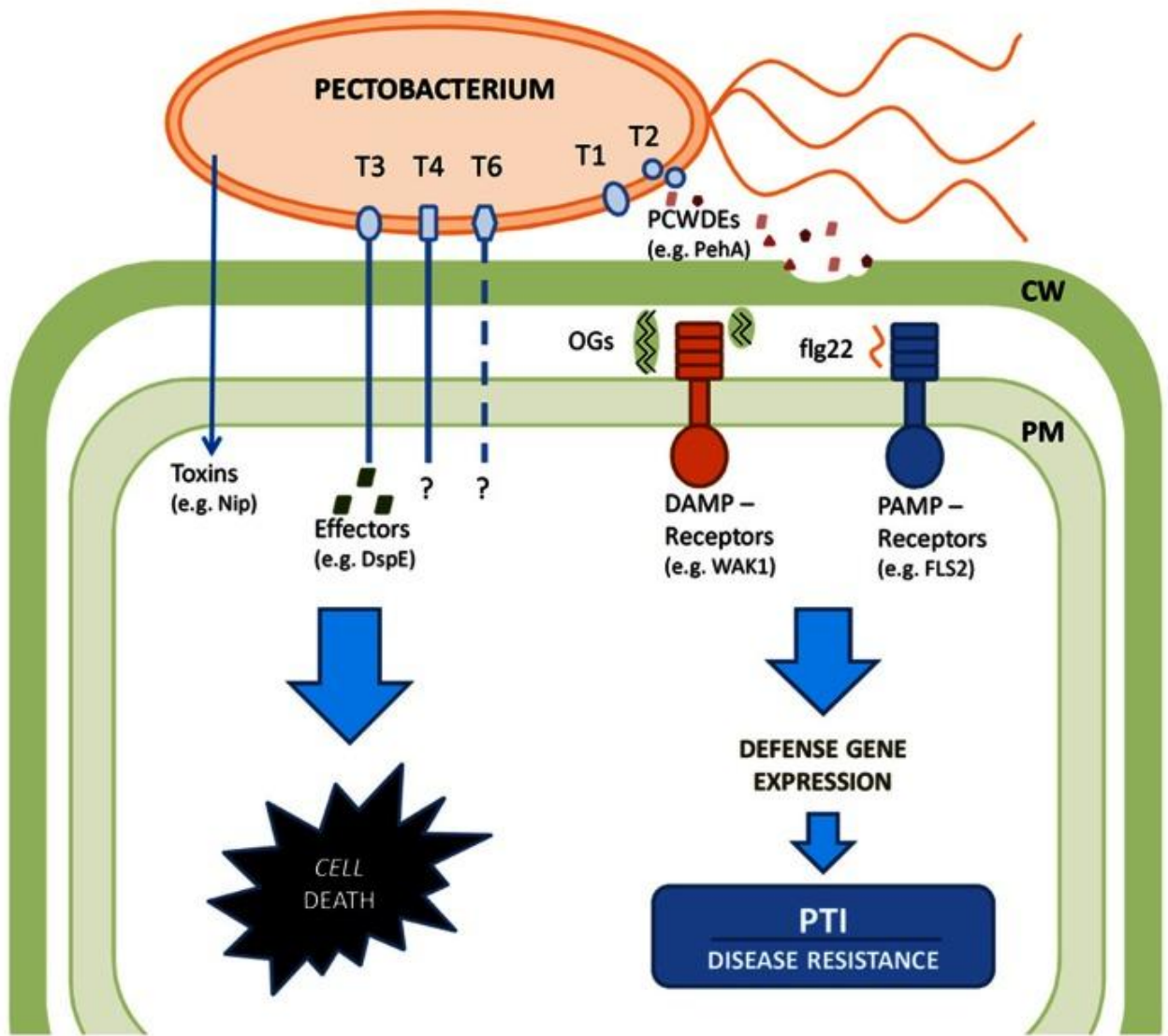


Figure 22. Principaux facteurs de virulence des *Pectobacterium* spp. (d'après Davidsson *et al.*, 2013). Les *Pectobacterium* spp. dépendent principalement des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire (PCWDE) secrétées via le SST2 qui leur permettent de macérer les tissus des plantes. La mort cellulaire est favorisée par la toxine Nip et l'effeteur DspE sécrété par le SST3. Les défenses de la plante (PTI) sont déclenchées suite à la détection des MAMP (flagelline flg22) ou des DAMP (oligogalacturonides OGs). Durant les stades précoces de l'infection, les bactéries ne déclenchent pas la PTI (production de PCWDE finement régulée, ce qui minimise par conséquent la génération de DAMP), alors que durant les stades tardifs de l'infection, les défenses de la plante sont inhibées suite à la production massive de PCWDE et la favorisation de la mort cellulaire.

détection d'un stimulus, une cascade de transduction du signal (qui fait intervenir des protéines cytoplasmiques Che) va avoir lieu. Cette transduction du signal résulte en l'interaction avec le moteur du flagelle pour contrôler la mobilité natatoire ("swimming motility") des bactéries.

Le rôle du chimiotactisme a été particulièrement étudié chez *R. solanacearum*. Cette bactérie s'avère en effet spécifiquement attirée par les exsudats racinaires secrétés par sa plante hôte (la tomate), mais pas par ceux secrétés par des plantes non hôtes. De plus, l'utilisation de mutants affectés dans leur capacité chimiotactique, mais qui sont mobiles, a permis de montrer que la mobilité dirigée par chimiotactisme, et non la mobilité aléatoire, est nécessaire à la colonisation de la plante *via* les racines (Yao et Allen, 2006). En revanche, le chimiotactisme et le flagelle ne sont pas nécessaires lorsque la bactérie colonise le xylème. En effet, les mutants affectés dans le chimiotactisme ou dans la mobilité flagellaire sont pathogènes au même titre que la souche sauvage lorsqu'ils sont inoculés directement dans la tige (Tans-Kersten *et al.*, 2001 ; Yao et Allen, 2006). *R. solanacearum* utilise donc le chimiotactisme et son flagelle polaire pour localiser et coloniser les racines de la plante hôte au cours des stades précoces du cycle infectieux. Une fois dans le système vasculaire, la bactérie perd son flagelle et la mobilité dirigée par chimiotactisme n'est plus nécessaire pour le développement de la maladie.

Contrairement à ce qui a été observé chez *R. solanacearum*, le chimiotactisme et la mobilité flagellaire chez *D. dadantii* sont non seulement impliqués dans la pénétration de la bactérie à travers les feuilles, mais aussi dans la colonisation de la pomme de terre (Antúñez-Lamas *et al.*, 2009). Cette bactérie utilise le chimiotactisme et la mobilité flagellaire avant de pénétrer dans la plante, et ces mêmes mécanismes seraient aussi déployés par *D. dadantii* durant les stades tardifs de l'infection pour quitter les tissus suffisamment macérés (épuisés de nutriments) et coloniser ainsi d'autres tissus.

Étant donné que la flagelline (un peptide conservé chez la majorité des bactéries) élicite les réactions de défense de la plante, certaines bactéries phytopathogènes comme *P. syringae* et *R. solanacearum* répriment vraisemblablement la synthèse du flagelle une fois à l'intérieur de la plante (Tans-Kersten *et al.*, 2001 ; Yu *et al.*, 2013). D'autres mécanismes que la mobilité natatoire sont donc utilisés par les bactéries phytopathogènes pour se déplacer le long des vaisseaux conducteurs de leur hôte. La mobilité reptatoire ou "twitching motility" fait intervenir les pili de type IV, des structures filamenteuses de surface associées à

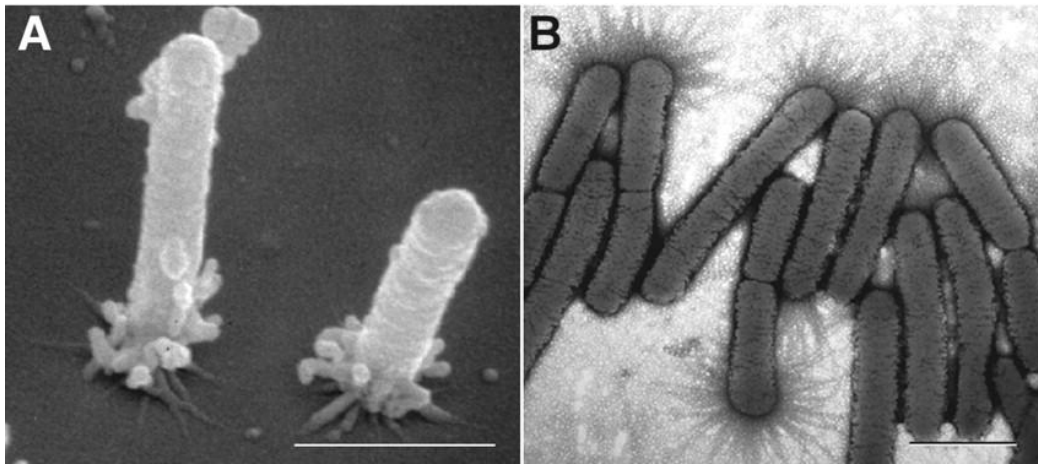


Figure 23. Pili de type IV observés chez une souche sauvage de *Xylella fastidiosa* en microscopie électronique (Meng *et al.*, 2005).

l'adhésion (Figure 23). Bien que ces pili ne semblent pas indispensables pour la pathogénie des bactéries foliaires telles que *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* et *P. syringae* pv. *tomato* (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997 ; Roine *et al.*, 1998), ils s'avèrent nécessaires chez les bactéries xylémiques comme *R. solanacearum* et *Xylella fastidiosa* pour la colonisation systémique de la plante (Liu *et al.*, 2001 ; Meng *et al.*, 2005).

Même si *Xylella fastidiosa* est aflagellée, cette bactérie colonise efficacement le xylème de son hôte en migrant contre le flux de sève. Elle possède deux types de pili : des pili courts de type I (codés par les gènes *fim*) et des pili longs de type IV (codés par les gènes *pil*) (Meng *et al.*, 2005). La mobilité de *Xylella fastidiosa* le long des faisceaux vasculaires dépend des pili longs de type IV qui lui permettent de se déplacer par "twitching". Les pili courts, quant à eux, ont un effet négatif sur la mobilité de *Xylella fastidiosa* et permettent plutôt l'attachement et la formation d'agrégats. *Xylella fastidiosa* semble donc maintenir un équilibre finement dosé entre ces deux types de pili. Leurs effets opposés permettent probablement à la bactérie de coloniser des niches écologiques très différentes que sont la plante hôte et l'insecte vecteur.

La mobilité reptatoire est également requise pour la virulence de *R. solanacearum* (Kang *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2001). Un mutant PilA de *R. solanacearum* n'est plus capable de s'attacher de manière polaire aux cellules de tabac et aux racines de la tomate. Ce même mutant est aussi affecté dans sa capacité à former des agrégats en culture liquide (Liu *et al.*, 2001). La bactérie régule ces deux traits opposés (mobilité reptatoire et agrégation) par un mécanisme taille de population-dépendant qui fait intervenir le régulateur PhcA (régulateur transcriptionnel de type LysR). A des densités bactériennes élevées, le régulateur PhcA réprime les mobilités natatoire et reptatoire et, en contre partie, favorise la production d'EPS, l'agrégation des cellules bactériennes et la formation de biofilms (Kang *et al.*, 2002).

2.3.2 L'adhésion

Comme c'est le cas chez les bactéries épiphytes, l'adhésion est cruciale pour la virulence des bactéries vasculaires. En effet, il s'agit de la première étape nécessaire pour la formation de biofilm, une structure qui provoque l'occlusion des vaisseaux vasculaires et par voie de conséquence les symptômes de flétrissement. L'attachement aux surfaces requiert principalement deux types de protéines de surface appelées adhésines fibrillaires (ex. pili de type IV) et adhésines non-fibrillaires (autotransporteurs, hémagglutinines, etc.) (cf.

paragraphe 1.3.2.1.2). Ces deux types d'adhésines contribuent individuellement, mais de manière complémentaire, à différents stades du processus infectieux (Darsonval *et al.*, 2009 ; Das *et al.*, 2009). A titre d'exemple, les adhésines XadA et XadB de *X. oryzae* pv. *oryzae* sont impliquées dans l'attachement de la bactérie à la phyllosphère du riz, alors que les adhésines YapH et PilQ sont requises pour la colonisation du xylème (Das *et al.*, 2009). En revanche, l'hémagglutinine FhaB de *X. axonopodis* pv. *citri* est requise à la fois pour la colonisation de la surface foliaire des agrumes et pour la colonisation de l'apoplaste (Gottig *et al.*, 2009).

Une étape cruciale du cycle infectieux de *Xylella fastidiosa* est l'attachement aux surfaces, notamment aux vaisseaux du xylème où la bactérie prolifère. Remarquablement, cette bactérie possède un nombre très important de gènes codant des adhésines fibrillaires et non-fibrillaires. Ces adhésines sont déterminantes pour la virulence de la bactérie *in planta* et pour l'adhésion de cette dernière aux intestins de son insecte vecteur (Chatterjee *et al.*, 2008b). En effet, la mutation des adhésines fibrillaires (FimA et FimF, protéines nécessaires pour l'assemblage des pili courts) ou des adhésines non-fibrillaires (une adhésine-like XadA et une hémagglutinine HxfB) provoque une diminution de la virulence de *Xylella fastidiosa* (Feil *et al.*, 2007). Les adhésines fibrillaires FimA et FimF sont aussi préférentiellement impliquées dans l'agrégation des cellules entre-elles, tandis que les adhésines non-fibrillaires sont plutôt associées à l'attachement des cellules bactériennes aux surfaces, d'où leur rôle dans la virulence de *Xylella fastidiosa*. La bactérie régule l'expression de ces adhésines par le QS (Chatterjee *et al.*, 2008b).

2.3.3 La production d'exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de sucres que les bactéries synthétisent en quantités importantes *in vitro* ou lors de leur multiplication *in planta*. Mis à part leur rôle dans la survie épiphyte, les EPS sont aussi essentiels pour la virulence et pour la formation de biofilms dans les tissus de la plante. Chez *D. dadantii*, un mutant d'EPS est moins efficace que la souche sauvage dans l'initiation de la macération des tissus et il s'avère incapable de produire les symptômes systémiques de pourriture (Condemine *et al.*, 1999). Chez cette espèce bactérienne, il y a une coordination entre la production d'EPS et d'autres facteurs de virulence, ce qui confère à ces EPS le statut de facteurs de virulence authentiques. En outre, les mutants d'*E. amylovora* et de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ne produisant pas d'EPS ne sont pas capables de former des biofilms dans le xylème et sont par conséquent

beaucoup moins virulents que les souches productrices d'EPS (Koczan *et al.*, 2009 ; Koutsoudis *et al.*, 2006). L'EPS produit par *Xylella fastidiosa* est associé à l'agrégation des cellules bactériennes entre-elles, mais pas à l'attachement aux surfaces (Souza *et al.*, 2006).

Les EPS sont importants pour assurer l'intégralité du biofilm et pour la formation d'un biofilm mature. Leur rôle précis dans le développement des maladies reste cependant non élucidé. Pour les bactéries vasculaires, la production d'EPS bloquerait la circulation de la sève brute et conduirait ainsi au flétrissement de la plante (Danhorn et Fuqua, 2007 ; Souza *et al.*, 2006). Le xanthane, EPS produit par les *Xanthomonas*, permet de supprimer les défenses préformées de la plante, notamment le dépôt de callose (Aslam *et al.*, 2008 ; Yun *et al.*, 2006). Etant donnée sa nature anionique, le xanthane chélaterait les ions calcium qui sont présents dans l'apoplaste et qui sont impliqués dans l'activation des réactions de défense. À l'inverse, les EPS produits par *R. solanacearum* jouent le rôle d'éliciteurs chez les variétés de tomate résistantes. En revanche, chez les variétés sensibles, ils sont nécessaires pour la virulence. La contribution des EPS à la virulence des bactéries phytopathogènes dépend donc aussi de la plante hôte (Milling *et al.*, 2011). Chez la plupart des bactéries phytopathogènes, la production d'EPS est régulée par le QS (cf. paragraphe 2.3.7). Chez les *Xanthomonas*, la production du xanthane est un processus demandeur d'énergie et fait intervenir deux systèmes de régulation contrôlés par les groupements de gènes *rpj* et *pig* (Diggle *et al.*, 2007).

2.3.4 La production de phytotoxines

La production de phytotoxines est une caractéristique des pathovars de *P. syringae*. Ces derniers synthétisent en effet une multitude de phytotoxines comme la coronatine, la syringomycine, la syringopeptine, la phaseolotoxine et la tabtoxine (Bender *et al.*, 1999). Ces phytotoxines ne sont pas hôte-spécifiques mais elles contribuent à la virulence des bactéries *in planta* et accentuent la sévérité des symptômes. Elles sont à l'origine des symptômes de chlorose (coronatine, phaseolotoxine et tabtoxine) ou des symptômes de nécroses (syringomycine et syringopeptine) provoqués par les bactéries. La coronatine est aussi requise pour le contournement de la fermeture des stomates, une réaction de défense mise en place suite à la détection des MAMP (Melotto *et al.*, 2006). Cette toxine active en effet la voie de signalisation de l'acide jasmonique qui est elle-même antagoniste de la voie de l'acide salicylique. Cette action a pour conséquence d'inhiber ou de retarder la mise en place des défenses de la plante induite par cette voie. Chez *P. syringae* pv. *tomato*, la coronatine permet

aussi le développement des symptômes de la maladie et la persistance de la bactérie *in planta* (Uppalapati *et al.*, 2007). Ce rôle n'est cependant pas dépendant de la suppression des réactions de défense induite par l'acide salicylique, mais pourrait être lié au fait que l'absence de la coronatine compromet l'expression d'autres facteurs de virulence (notamment le SST3 Hrp). La production de la coronatine et l'expression des gènes *hrp* sont notamment co-régulées chez *P. syringae* pv. *tomato*.

La syringomycine, quant à elle, induit une perturbation des flux d'ions et une alcalinisation de l'apoplaste suite à la création de pores au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales. Cette action conduit au relargage de nutriments à partir des cellules végétales et favorise ainsi la croissance des bactéries (Hutchison *et al.*, 1995). La phaseolotoxine et la tabtoxine contribuent à la virulence en induisant des modifications locales ou systémiques dans le métabolisme de la plante (Bender *et al.*, 1999). Un cluster de gènes similaire au cluster *cfa* des *Pseudomonas* qui code la coronatine a été identifié chez *Pectobacterium atropense*. La mutation des gènes *cfa5* et *cfa6* provoque une diminution de la virulence de la bactérie sur pomme de terre (Bell *et al.*, 2004).

Peu d'espèces du genre *Xanthomonas* sont connues pour produire des phytotoxines. *X. retroflexus* produit une toxine qui dégrade les chloroplastes et les mitochondries d'une amarante (Sun *et al.*, 2006). La toxine produite par *X. oryzae* provoque la mort du tissu végétal après infiltration dans des feuilles de riz (Dubey, 1983). La toxine la plus réputée et la plus étudiée du genre *Xanthomonas* est très certainement l'albicidine produite par *X. albilineans*, l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre (Birch, 2001). L'albicidine, en inhibant la différenciation des chloroplastes, provoque des symptômes de ligne blanche et de chlorose du feuillage. Cette toxine a également des propriétés antibiotiques et elle constitue un puissant inhibiteur de l'ADN gyrase des organismes procaryotes (Hashimi *et al.*, 2007).

2.3.5 La dégradation de la paroi végétale

La paroi végétale constitue la première barrière physique que les bactéries rencontrent une fois dans les tissus de la plante. Elle forme un exosquelette autour de la cellule végétale et elle est composée d'une structure qui forme un réseau très complexe de polysaccharides, incluant la cellulose, l'hémicellulose et les pectines. Certaines bactéries phytopathogènes ont la capacité de dégrader la paroi végétale pour l'utiliser comme source de carbone et d'énergie

d'une part, mais aussi pour se propager dans les tissus de l'hôte d'autre part (Büttner et Bonas, 2009 ; Toth *et al.*, 2003 ; Van Sluys *et al.*, 2002).

Les enzymes hydrolytiques telles que les protéases, les lipases, les phospholipases, ainsi que plusieurs PCWDE, sont secrétées *via* le système de sécrétion de type II (SST2). Les PCWDE constituent l'arme principale et destructive utilisée par les bactéries anciennement classées dans le genre *Erwinia* (*Dickeya* et *Pectobacterium*), et elles sont essentielles pour l'initiation de la maladie et l'apparition des symptômes de pourriture molle (Barras *et al.*, 1994 ; Charkowski *et al.*, 2012 ; Pérombelon, 2002 ; Toth *et al.*, 2003). Une phase de latence pendant laquelle les bactéries se multiplient dans leur plante hôte sans causer de symptômes a été reportée chez les *Erwinia*. La transition de ce mode de vie biotrophe (phase de latence) vers un mode de vie nécrotrophe (symptôme de pourriture) chez ces agents pathogènes implique le QS. Lorsque les populations bactériennes atteignent des densités élevées dans les tissus de la plante, le QS active et coordonne la production de quantités importantes de PCWDE et d'autres facteurs de virulence, ce qui se traduit par l'apparition des symptômes de pourriture (Liu *et al.*, 2008 ; Pérombelon, 2002 ; Toth *et al.*, 2003). Parmi l'arsenal de PCWDE produit par les *erwinia*, les pectinases sont majoritairement responsables de la macération des tissus et de la mort cellulaire. Plusieurs familles et isoformes de pectinases, à savoir les pectates lyases, les pectines lyases, les pectines méthylestérases et les polygalacturonases existent dans le génome des *erwinia*. Le génome de *Pectobacterium atrosepticum* code 20 pectinases (Bell *et al.*, 2004). Ces pectinases sont collectivement essentielles pour la pathogénie de ces bactéries, mais elles sont individuellement dispensables pour la macération des tissus parenchymateux (Jafra *et al.*, 1999).

Les PCWDE jouent également un rôle dans la pathogénie d'autres bactéries phytopathogènes comme *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. campestris* pv. *campestris*, *R. solanacearum* et *Xylella fastidiosa* (Büttner et Bonas, 2009 ; Liu *et al.*, 2005 ; Roper *et al.*, 2007). En revanche, *E. amylovora* ne possède pas de gènes codant des PCWDE (Sebaihia *et al.*, 2010). Une seule copie d'un gène codant une polygalacturonase a été mise en évidence chez la souche de *Xylella fastidiosa* responsable de la maladie de Pierce de la vigne. Cette polygalacturonase s'est avérée indispensable pour la migration de la bactérie d'un vaisseau à l'autre, et pour la colonisation systémique de la vigne (Roper *et al.*, 2007). *Xylella fastidiosa* migre en effet dans le xylème suite à la destruction des ponctuations « pits » de la paroi des vaisseaux du xylème. La polygalacturonase permet la dégradation de polymères de la pectine, constituant majeur de ces ponctuations (Pérez-Donoso *et al.*, 2010). Chez *X. oryzae* pv.

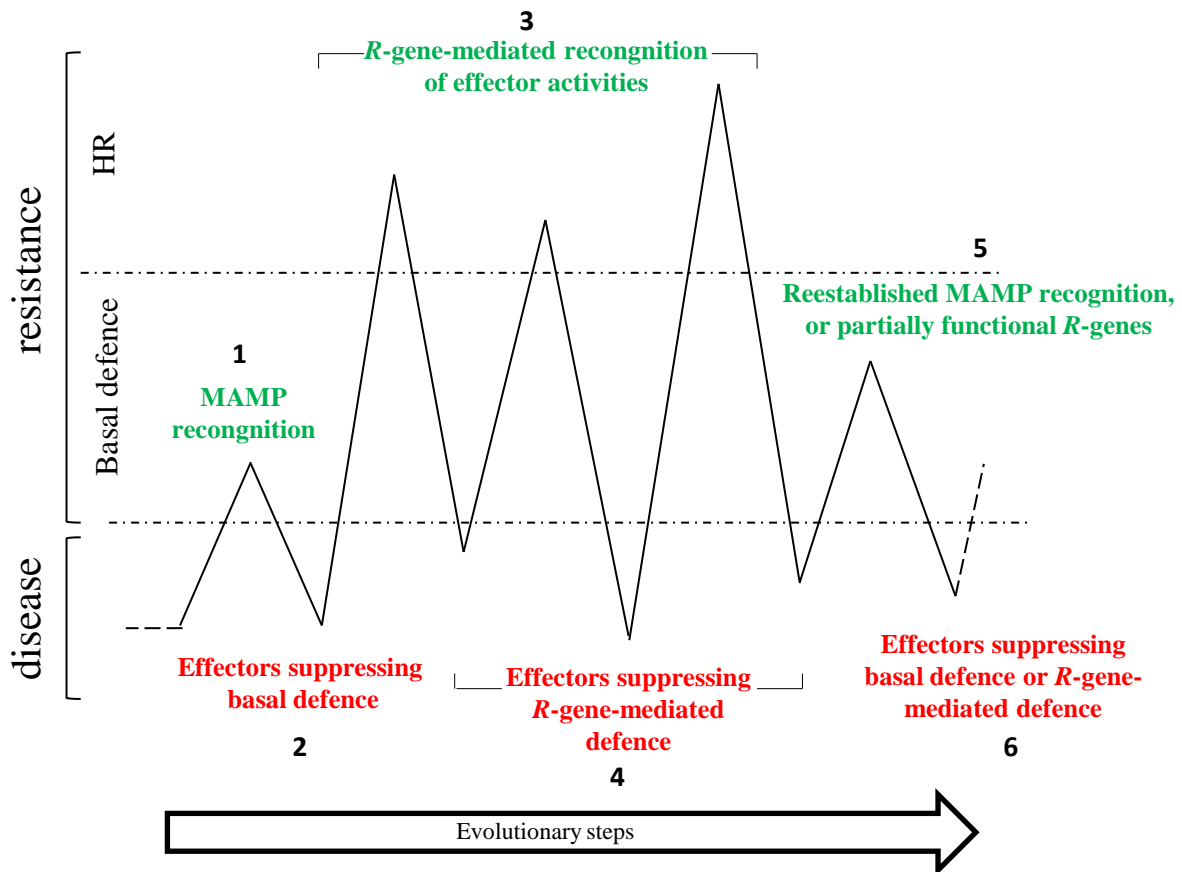


Figure 24. Illustration des interactions plante-agent pathogène (d'après Boch, 2009). (1) Dans une première phase, les éliciteurs de type MAMP sont reconnus par la plante et déclenchent les défenses basales. (2) Les bactéries déploient le SST3 et injectent des effecteurs dans la cellule végétale ce qui permet de supprimer les défenses basales. (3) La reconnaissance spécifique de ces effecteurs par les protéines de résistance R permet la mise en place de la réponse hypersensible (HR) et le développement d'une résistance gène-pour-gène. (4) Les bactéries secrètent d'autres effecteurs qui permettent de contourner la résistance gène-pour-gène. (5) De nouvelles protéines R sont alors sélectionnées et (6) les bactéries modifient les effecteurs reconnus à ce qu'ils ne le soient plus, ou en acquièrent de nouveaux, de manière à permettre de nouveau la suppression de la résistance basale.

oryzae, plusieurs enzymes hydrolytiques et notamment une xylanase, une cellulase et une endoglucanase, sont induites *in planta* et sont impliquées dans l'apparition des symptômes chez le riz. En revanche, aucune activité relative à ces enzymes n'a été détectée chez le pathovar *oryzicola* de *X. oryzae* (Sun *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2007). Toutefois, une étude récente a montré qu'une protéase sécrétée *via* le SST2 est impliquée dans la virulence chez le pathovar *oryzicola*, mais elle est sans importance chez le pathovar *oryzae* (Zou *et al.*, 2012). Cette protéase pourrait donc être un facteur de virulence associé à la spécificité tissulaire (Zou *et al.*, 2012). Le pathovar *oryzae* se multiplie en effet dans le xylème du riz, où les parois des vaisseaux sont constituées essentiellement de lignine, alors que le pathovar *oryzicola* se multiplie dans les espaces intercellulaires des cellules du parenchyme où les parois cellulaires contiennent des composés protéinogènes.

Par ailleurs, les fragments de paroi libérés par l'action des enzymes sécrétée *via* le SST2 ont une action élicitrice et sont reconnus par la plante comme des DAMP (pour « Damage-Associated Molecular Patterns »). Chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, les mécanismes de défense induits par les enzymes hydrolytiques sont contournés suite à la sécrétion de protéines effectrices *via* le SST3 Hrp (Jha *et al.*, 2007).

2.3.6 Le SST3 Hrp et ses effecteurs

Afin de contourner les mécanismes de défense de la plante, les bactéries phytopathogènes ont développé, au cours de leur évolution, une stratégie sophistiquée leur permettant de manipuler discrètement mais efficacement les processus ayant lieu dans la cellule végétale (Figure 24). Les bactéries phytopathogènes injectent en effet dans la cellule végétale des protéines effectrices dont le rôle essentiel est d'inhiber les mécanismes de défense mis en place par la plante hôte. Ces effecteurs sont sécrétés directement dans le cytosol de la cellule eucaryote *via* le système de sécrétion de type III (SST3) de la famille des injectisomes Hrp (pour « **h**ypersensitive **r**esponse and **p**athogenicity ») (Boch et Bonas, 2010 ; Büttner et Bonas, 2006; Kay et Bonas, 2009). Ce SST3 constitue une véritable seringue dont le corps basal est ancré entre les deux membranes bactériennes et se prolonge par un pilus extracellulaire qui peut s'étendre sur plusieurs micromètres de long et traverser la paroi de la cellule végétale (Figure 25). Ce pilus est terminé par un translocon qui est directement inséré dans la membrane de la cellule eucaryote et il forme un pore permettant le passage des effecteurs du pilus vers le cytosol de la cellule végétale.

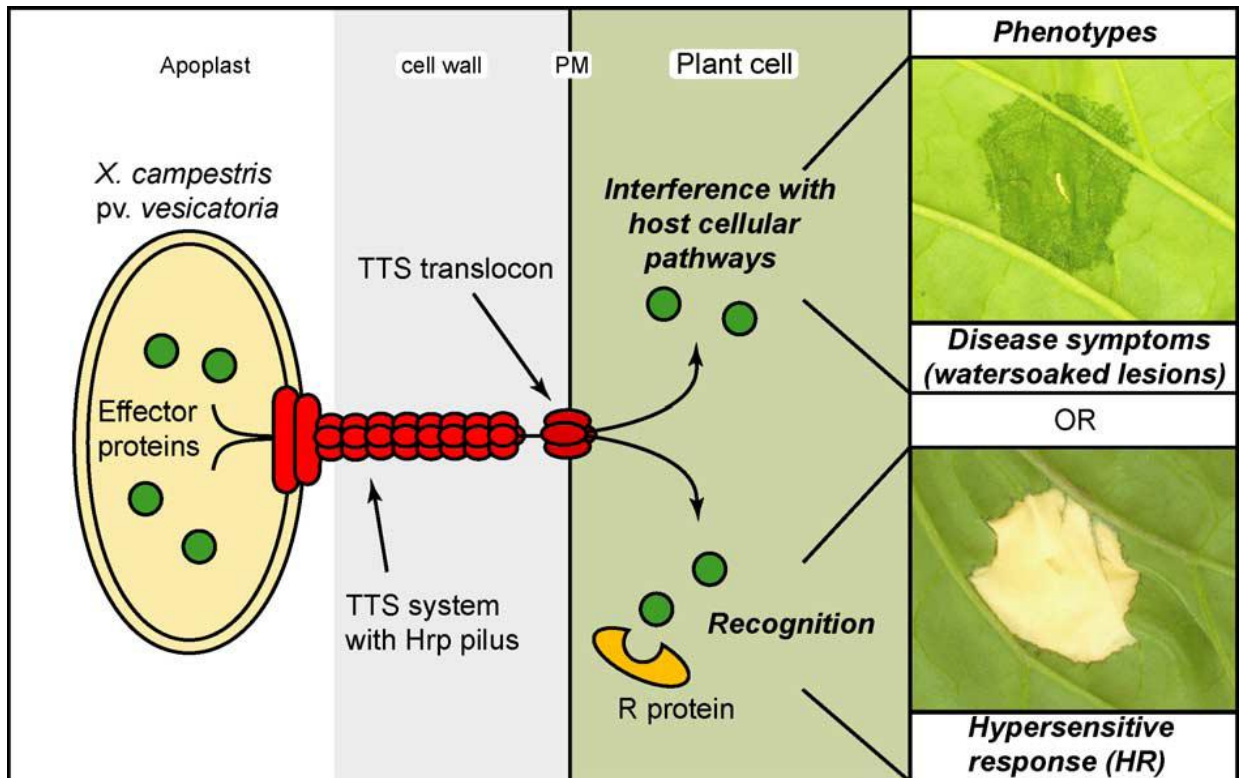


Figure 25. Modèle illustrant l'interaction de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* avec des plantes hôtes sensibles et résistantes (d'après Büttner *et al.*, 2003). Le SST3 de la bactérie traverse la membrane bactérienne ainsi que la paroi cellulaire de la plante. Dès que le contact avec la cellule hôte est établi, les protéines effectrices sont injectées *via* le SST3 dans le cytosol de la cellule eucaryote. Chez les plantes sensibles, les protéines effectrices interfèrent avec les processus ayant lieu dans la plante hôte, ce qui provoque l'apparition des symptômes de la maladie. Chez les plantes résistantes, les protéines effectrices sont reconnues par les protéines R, ce qui induit la HR. PM : membrane plasmique ; TTS : sécrétion de type 3.

Les gènes *hrp* codant le SST3 ne sont pas exprimés de manière constitutive. Leur expression est en effet activée lorsque la bactérie entre dans la plante ou encore *in vitro* dans un milieu de culture inducteur (Büttner et Bonas, 2009). Ce système de sécrétion est le principal facteur de pathogénie des *Xanthomonas*, des pathovars de *P. syringae*, d'*E. amylovora* et de *R. solanacearum* (Bocsanczy *et al.*, 2008 ; Lindeberg, 2012 ; Poueymiro et Genin, 2009). Ces bactéries phytopathogènes coordonnent et régulent ainsi la sécrétion d'un nombre très important d'effecteurs dès le début de l'infection, pour inhiber ou contourner les défenses de la plante, ce qui leur permet de se multiplier, de tirer profit de la cellule végétale et de promouvoir la maladie.

Bien que le nombre d'effecteurs sécrétés par chaque espèce bactérienne soit variable, une cinquantaine de familles d'effecteurs a été identifiée à ce jour. Les souches de *Xanthomonas* séquencées codent de 30 à 50 effecteurs (Lindeberg, 2012); le nombre d'effecteurs le plus important a été associé à *X. oryzae* pv. *oryzae* (Salzberg *et al.*, 2008). Avec 34 effecteurs, *P. syringae* pv. *tomato* code le nombre le plus important d'effecteurs parmi les pathovars de *P. syringae* (Baltrus *et al.*, 2011). Ces effecteurs ciblent et modulent plusieurs fonctions de la cellule végétale au profit de l'agent pathogène. Ils sont impliqués dans l'altération de la réponse basale de l'hôte en bloquant, par exemple, les voies de signalisation hormonale de la plante. Ils peuvent cependant aussi interférer dans la HR (Abramovitch et Martin, 2004 ; Boch *et al.*, 2009 ; Grant *et al.*, 2006). A titre d'exemple, l'effecteur AvrPtoB de *P. syringae* pv. *tomato* inhibe aussi bien la mort cellulaire que les défenses basales de la plante (dépôt de callose) (Abramovitch *et al.*, 2003). Le domaine N-terminal d'AvrPtoB est suffisant pour supprimer les défenses basales, et le domaine C-terminal facilite quant à lui le contournement de la HR chez la tomate. D'autres effecteurs comme AvrBs3 miment les activateurs transcriptionnels de la plante. Ils stimulent ainsi l'apparition des symptômes de la maladie et la dispersion de l'agent pathogène à d'autres plantes au cours des étapes tardives du processus infectieux (Kay *et al.*, 2007).

En revanche, chez d'autres bactéries phytopathogènes, notamment les *Pectobacterium* et *D. dadantii*, le SST3 ne semble pas être indispensable pour leur pathogénie (Charkowski *et al.*, 2012). En effet, la mutation du SST3 chez ces bactéries n'a qu'un effet mineur sur la virulence et elle n'induit pas une HR comme c'est le cas chez les *Xanthomonas* et les *Pseudomonas*. Un seul effecteur, nommé DspE, a été identifié chez *Pectobacterium carotovorum*. Cet effecteur n'inhibe pas les défenses basales de la plante mais, au contraire, élécite la mort cellulaire programmée au niveau des feuilles de tabac (Kim *et al.*, 2011).

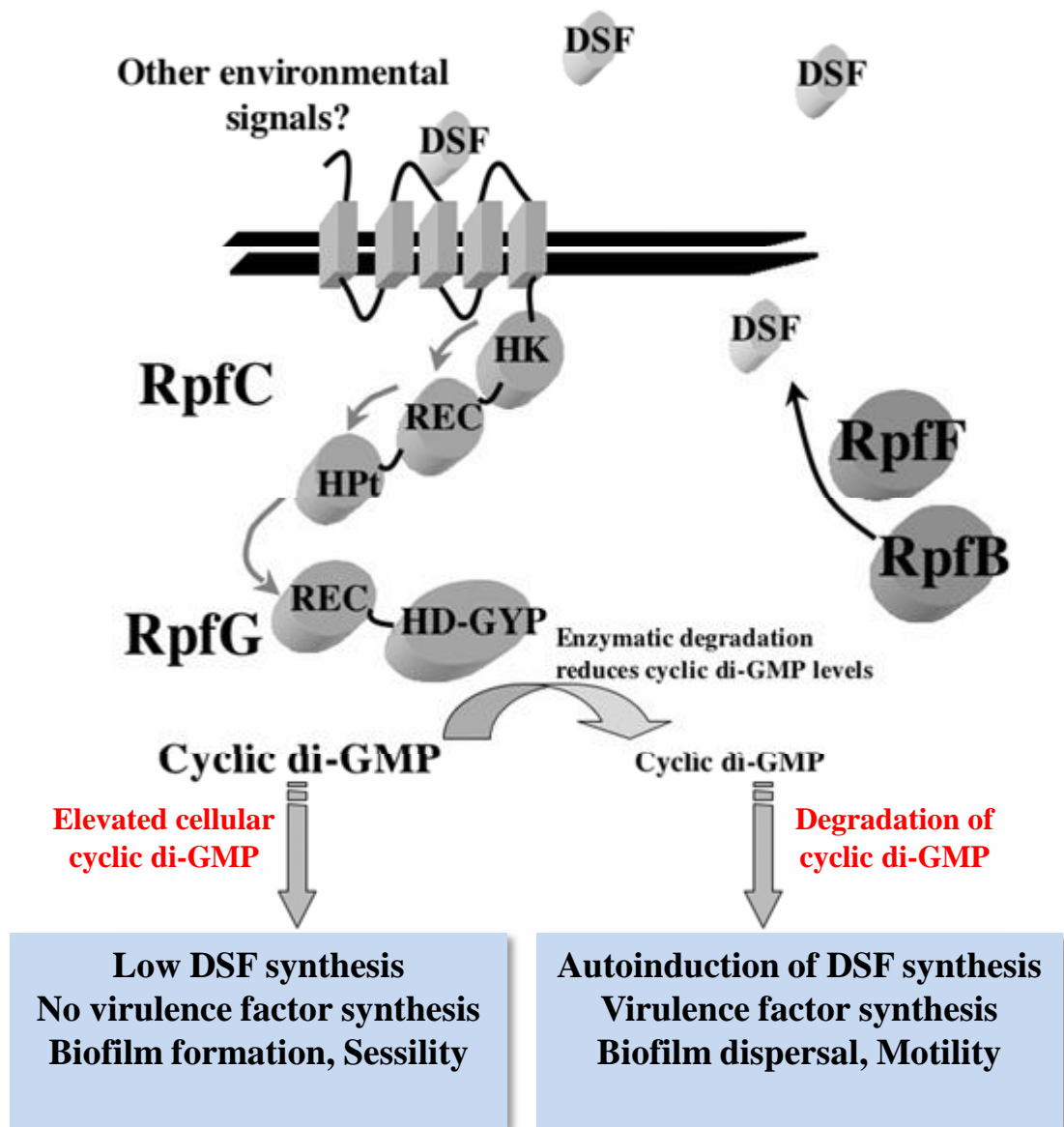


Figure 26. Perception du DSF et transduction du signal chez *X. campestris* (d'après Dow *et al.*, 2006 et 2009). La synthèse du signal DSF est réalisée par la protéine RpfF et dépend partiellement de la protéine RpfB. Le signal DSF est détecté par le système de régulation à deux composants RpfC/RpfG. La phosphorylation du régulateur RpfG (une phosphodiésterase qui hydrolyse le di-GMPc, un messager secondaire intracellulaire) induit une altération du niveau intracellulaire du di-GMPc. Un niveau faible du di-GMPc favorise l'expression des facteurs de virulence, la dispersion du biofilm et la mobilité des bactéries. RpfC peut détecter d'autres signaux environnementaux. Les rectangles représentent les hélices transmembranaires, REC est un domaine CheY-like, HPT est un domaine transmetteur de groupement phosphate et HK est un domaine histidine kinase.

Ces bactéries adaptent donc le SST3 en fonction de leur mode de vie nécrotrophe et l'utilisent pour promouvoir la macération des tissus au niveau des feuilles (Hogan *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2011). De plus, certaines souches de *Pectobacterium* et de *Dickeya* ne possèdent pas le SST3 Hrp (Kim *et al.*, 2009a ; Pitman *et al.*, 2010). Ces souches sont toutefois capables de provoquer la macération des tiges et des tubercules de pomme de terre, mais elles ne peuvent pas infecter les feuilles. Ces observations suggèrent que le SST3 Hrp permet à *Pectobacterium carotovorum* d'élargir la gamme de tissus qu'elle peut infecter (en incluant les feuilles) (Charkowski *et al.*, 2012 ; Hogan *et al.*, 2013).

D'autres bactéries phytopathogènes comme *X. albilineans* et *Xylella fastidiosa* ne possèdent pas non plus ce système de sécrétion (Simpson *et al.*, 2000 ; Pieretti *et al.*, 2009). « Comment contournent-elles ou suppriment-elles les réactions de défense de la plante ? » reste jusqu'à présent une question sans réponse.

2.3.7 Le quorum-sensing : régulation de l'expression des gènes de virulence

Afin de réguler et de synchroniser leur comportement, leur physiologie et l'expression des gènes de virulence, les bactéries phytopathogènes communiquent entre elles par l'intermédiaire de molécules signal. Cette propriété de communication intercellulaire est taille de population-dépendante et appelée « quorum-sensing » (QS) (Diggle *et al.*, 2007 ; Ryan et Dow, 2011). Les bactéries produisent en effet des molécules signal qui s'accumulent dans le milieu extracellulaire et qui peuvent, suite à l'augmentation de la densité de la population bactérienne, atteindre un seuil critique. Cette situation permet d'activer des récepteurs protéiques spécifiques qui à leur tour permettent la régulation de nombreuses fonctions cellulaires.

Les bactéries phytopathogènes synthétisent des molécules signal de nature chimique différente ; on peut ainsi citer les *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) produites par les *Pseudomonas* et les *erwiniae*, l'acide méthyl-ester-3-hydroxypalmitique (3-OH-PAME) produit par *R. solanacearum*, et l'acide cis-11-méthyl-2-dodécenoïque produit par les *Xanthomonas*. Cette diversité de structure reflète la capacité qu'a chaque espèce bactérienne à adapter les traits régulés par le QS en fonction de son mode de vie et de son besoin de coloniser différentes niches écologiques. Chez ces bactéries, le QS permet, suite à une cascade de réactions complexes, de réguler un certain nombre de fonctions comme le chimio-tactisme, la mobilité, la production d'EPS, la formation et la dispersion du biofilms, le

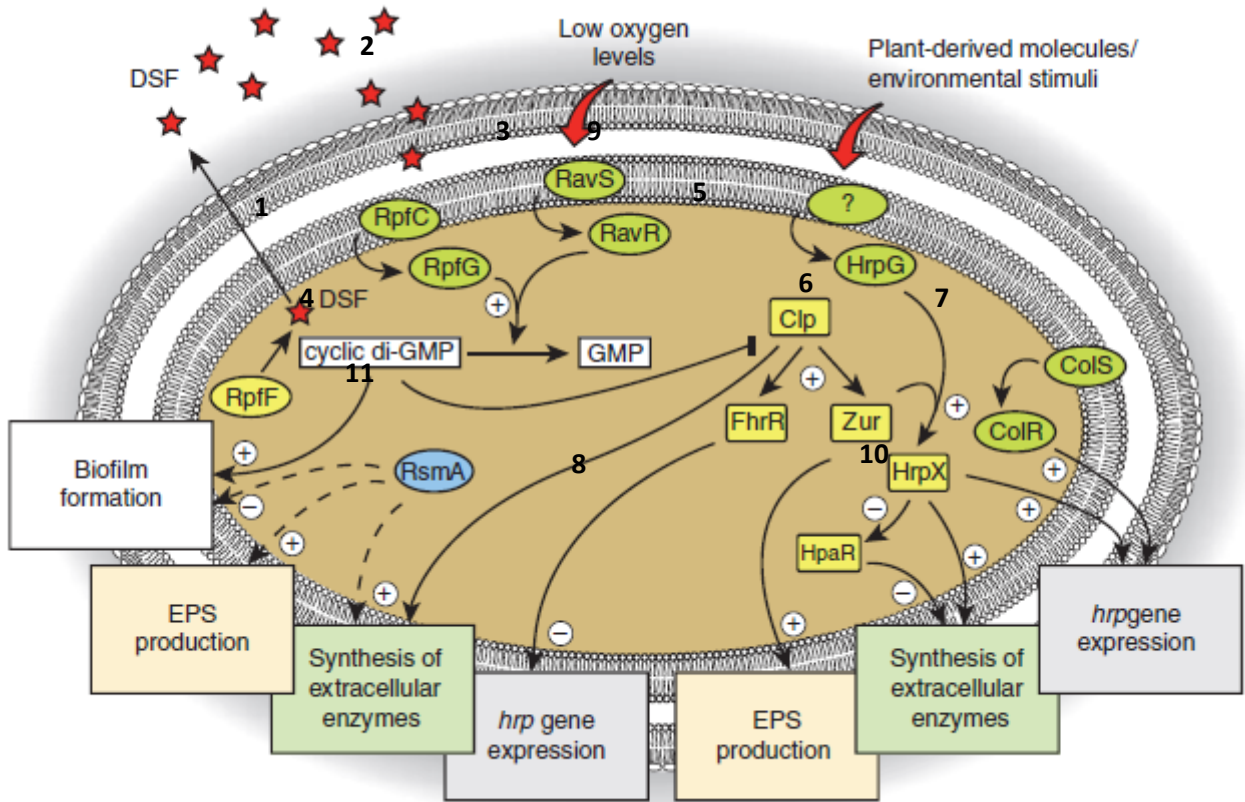


Figure 27. Voies de régulation contrôlant l'expression des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *X. campestris* pv. *campestris* (d'après Büttner et Bonas, 2009).

(1) La protéine RpfF est une hydratase enoyl-CoA impliquée dans la synthèse de DSF, la molécule diffusible du quorum sensing. Cette molécule s'accumule dans le milieu extracellulaire durant la phase stationnaire de croissance. (2) Le DSF est détecté par le système de régulation à deux composants RpfC/RpfG. (3) Le régulateur RpfG est une phosphodiesterase impliquée dans l'hydrolyse d'un messager secondaire intracellulaire, le di-GMP cyclique. (4) Un niveau faible de di-GMPc active l'expression des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène alors qu'un niveau élevé de di-GMPc favorise la formation de biofilms et (5) réprime la fixation du régulateur transcriptionnel Clp aux promoteurs des gènes cibles. Clp active l'expression des gènes codant les enzymes extracellulaires, les composants du SST2 et SST3, des gènes impliqués dans la synthèse des EPS et (6) l'expression des gènes régulateurs *fhrR* et *zur*. (7) L'activateur transcriptionnel Zur et le régulateur HrpG activent l'expression du gène *hrpX* qui code un régulateur contrôlant l'expression des gènes *hrp*. (8) Le régulateur FhrR régule l'expression des gènes codant le flagelle et les gènes *hrp*. (9) Un autre système de signalisation à deux composants RavS/RavR contribue à l'hydrolyse du di-GMPc. (10) HrpX régule l'expression du gène *hpaR* codant un régulateur transcriptionnel qui inhibe la synthèse de protéase extracellulaire. (11) Le régulateur post-transcriptionnel RsmA active la synthèse d'EPS, d'endoglucanases et d'amylases extracellulaires et inhibe la formation de biofilms.

transfert horizontal d'ADN, et l'expression de gènes de virulence (gènes *hrp*, PCWDE) (Figures 26 et 27) (Dow, 2008 ; Ryan et Dow, 2011 ; Von Bodman *et al.*, 2003).

Chez *Pectobacterium atrosepticum*, le QS régule un quart des gènes de la bactérie et il est essentiel pour l'initiation du processus infectieux. Il régule en effet la transition d'un mode de vie biotrophe, pendant lequel la bactérie se développe dans la plante sans provoquer de symptômes, vers un mode de vie nécrotrophe pendant lequel la bactérie provoque la macération des tissus suite à la sécrétion des PCWDE et d'autres facteurs de pathogénie (Liu *et al.*, 2008).

Chez les *Xanthomonas*, deux facteurs diffusibles ont été identifiés : le DF (« Diffusible Factor », butyrolactone) et le DSF (« Diffusible Signal Factor »). Le DF est impliqué dans la régulation de la production de xanthomonadine et d'EPS chez *X. campestris* pv. *campestris* (Poplawsky *et al.*, 1998). Le DSF est la molécule de QS la mieux caractérisée chez les *Xanthomonas* (Dow, 2008 ; He et Zhang, 2008 ; Ryan et Dow, 2011). Une molécule DSF-like est également produite par *Xylella fastidiosa* (Chatterjee *et al.*, 2008a). Ce signal diffusible a été mis en évidence pour la première fois chez *X. campestris* pv. *campestris* (Tang *et al.*, 1991). De même, la voie de transduction du signal DSF permettant la régulation de diverses fonctions a été très étudiée chez cette espèce bactérienne (Ryan et Dow, 2011).

Chez *X. campestris* pv. *campestris*, le DSF régule environ 165 gènes, et notamment un certain nombre de gènes de virulence (He et Zhang, 2008 ; Ryan *et al.*, 2007). La synthèse du signal DSF est réalisée par la protéine RpfF et elle dépend partiellement de la protéine RpfB (Figure 26). Etant donnée sa nature lipophile, le DSF est supposé pouvoir diffuser à travers la membrane bactérienne et s'accumuler dans le milieu extracellulaire durant la phase stationnaire de croissance. La détection et la transduction du DSF dépendent d'un système de régulation à deux composantes qui comprend un senseur kinase RpfC et un régulateur RpfG. La perception du DSF par RpfC induit, suite à une cascade de phosphorylation, l'activation de RpfG qui agit comme une phosphodiésterase et provoque l'hydrolyse du di-GMP cyclique (di-GMPc ; un messager secondaire intracellulaire) (Figure 26). L'altération du niveau intracellulaire du di-GMPc favorise l'expression de gènes impliqués dans la pathogénie, la dispersion du biofilm et la motilité de *X. campestris* pv. *campestris* (He *et al.*, 2006 ; Ryan et Dow, 2011). La synthèse de facteurs de virulence est activée par un régulateur transcriptionnel Clp (« cAMP receptor protein ») qui à son tour est activé par un niveau faible du di-GMPc. Chez *X. campestris* pv. *campestris*, le régulateur Clp active l'expression des

Tableau 7. Phénotypes associés à la mutation de différents gènes *rpf* chez des bactéries DSF-dépendantes (d'après Chatterjee *et al.*, 2008a).

DSF producing strains	Phenotypes due to mutations in different <i>rpf</i> genes		
	<i>rpfF</i>	<i>rpfC</i>	<i>rpfG</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Xcc)	Virulence deficient Extracellular polysaccharide (EPS) deficient Deficient in extracellular enzymes-endoglucanase, polygalacturonase	Virulence deficient EPS deficient Deficient in extracellular enzymes and EPS	Virulence deficient EPS deficient Deficient in extracellular enzymes and EPS
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Deficient in virulence EPS proficient Proficient in extracellular enzymes such as xylanase Deficient in iron uptake	Proficient in in planta growth but deficient in symptom development EPS deficient Proficient in extracellular enzyme production n.d	n.d n.d n.d n.d
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	Deficient in virulence Deficient in EPS production Deficient in extracellular enzymes such as endoglucanase and protease	Deficient in virulence; deficiency more severe compared to the <i>rpfF</i> mutant Deficient in EPS production Deficient in extracellular enzymes such as endoglucanase and protease	n.d n.d n.d
<i>Xylella fastidiosa</i> (PD strain-Temecula)	Hyper virulent on grape Deficient in insect colonization and transmission Deficient in biofilm formation and attachment compared to the wild type strain	Reduced virulence on grape Able to colonize insect but deficient in transmission Proficient in in vitro attachment and biofilm formation than the wild type	n.d n.d n.d
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Strain WR-C	Effectuated in iron uptake and motility Proficient in extra cellular protease production Proficient in biofilm production Reduced motility and production of extracellular protease Reduced tolerance to antibiotics and heavy metals	n.d n.d n.d n.d n.d	n.d n.d n.d n.d n.d
Strain K279a	Deficient in microcolony formation (biofilm)	n.d	n.d

n.d indicates not determined

composants du SST2 et du SST3, la production d'enzymes extracellulaires et d'EPS (Figure 27). Lorsque la concentration du DSF est faible, le niveau élevé du di-GMPc favorise la formation de biofilm (Ryan *et al.*, 2007).

Bien que les gènes *rpf* soient conservés chez les espèces du genre *Xanthomonas* et partagent une certaine similarité avec ceux de *Xylella fastidiosa*, des phénotypes différents sont obtenus suite à la mutation de ces derniers (Tableau 7). La régulation DSF-dépendante des gènes varie donc considérablement d'une espèce à une autre et reflète des modes de vie différents (Büttner et Bonas, 2009 ; Chatterjee *et al.*, 2008a ; Dow, 2008 ; Rott *et al.*, 2013).

2.3.8 Autres stratégies

Les bactéries phytopathogènes déploient diverses stratégies, dont certaines sont décrites ci-dessus, pour coloniser les tissus de la plante hôte. Certaines stratégies sont communes à plusieurs genres bactériens alors que d'autres peuvent être spécifiques à un genre voire à une espèce donnée. Ces stratégies n'ont très certainement pas été encore toutes découvertes. De nouveaux mécanismes enzymatiques tels que le système CUT (pour « Carbohydrate Utilization Containing TBDT ») sont actuellement en cours d'investigation (Boulanger *et al.*, 2010). La pathogénie des bactéries limitées au xylème ou celle dépourvues de SST3 Hrp est très mal connue et leur étude devrait permettre de continuer à identifier les stratégies mises en œuvre par les bactéries phytopathogènes pour causer des maladies.

PARTIE 2: LE PATHOSYSTÈME CANNE À SUCRE - *XANTHOMONAS ALBILINEANS*

1 LA PLANTE HÔTE : LA CANNE À SUCRE

1.1 Biologie, taxonomie et génétique

La canne à sucre est une culture très ancienne dont les premières traces remonteraient à 2500 ans avant notre ère (Daniels et Roach, 1987). Cette plante herbacée pluriannuelle a un cycle biologique d'environ 12 à 18 mois dans les conditions tropicales, et elle est récoltée le plus souvent annuellement. C'est une monocotylédone appartenant à la famille des *Poaceae*, à la tribu des *Andropogoneae* et au genre *Saccharum*. Le genre *Saccharum* est originaire de l'Asie du Sud-Est et comprend six espèces connues à ce jour, dont deux espèces sauvages dépourvues de sucre (*Saccharum spontaneum* et *S. robustum*), et quatre espèces domestiquées, riches en sucre (*S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* et *S. edule*) (Daniels et Roach, 1987). Les espèces *S. barberi* et *S. sinense* sont des hybrides naturels de *S. officinarum* et *S. spontaneum* (D'Hont *et al.*, 2002), tandis que l'espèce *S. officinarum* aurait été domestiquée à partir de *S. robustum* (D'Hont *et al.*, 1993).

Appelée aussi canne noble, l'espèce *S. officinarum* est l'espèce sucrière par excellence, cependant, cette dernière est la plus sensible aux attaques parasitaires. Dans le but d'améliorer le rendement en sucre (notamment au travers de meilleurs niveaux de résistance aux agents pathogènes), la canne noble a été croisée avec d'autres espèces apparentées (Daniels et Roach, 1987). La plupart des cultivars modernes de canne à sucre (*Saccharum* spp.) provient essentiellement des hybridations interspécifiques réalisées au début du 20^{ème} siècle entre l'espèce sauvage *S. spontaneum* et l'espèce noble *S. officinarum* (Daniels et Roach, 1987 ; Grivet et Arruda, 2002). Compte tenu de l'origine interspécifique de la canne à sucre (D'Hont *et al.*, 1993; D'Hont *et al.*, 2002), cette plante a un génome très complexe et se caractérise par un niveau de ploïdie élevé (D'Hont et Glaszmann, 2001). *S. officinarum* est octoploïde et possède 10 chromosomes de base ($2n = 80$), alors que *S. spontaneum* possède 8 chromosomes de base et son niveau de ploïdie varie entre 8 et 12 ($2n = 40$ à 128) (D'Hont *et al.*, 1998). Les cultivars modernes sont donc hautement polyploïdes et aneuploïdes ($2n = 100$ à 130), avec une taille de génome d'environ 10 000 Mb (D'Hont et Glaszmann, 2001).

Tableau 8. Les 10 premiers pays producteurs de canne à sucre pour l'année 2011
(<http://faostat.fao.org>).

Position	Région	Production (Tonnes)
1	Brésil	734006000
2	Inde	342382000
3	Chine	115123560
4	Thaïlande	95950400
5	Pakistan	55308500
6	Mexique	49735300
7	Philippines	34000000
8	États-Unis d'Amérique	26655800
9	Australie	25181800
10	Argentine	25000000

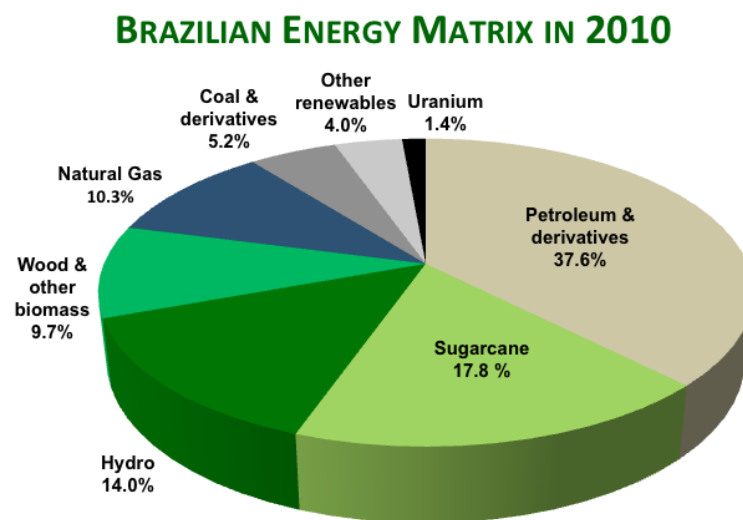


Figure 28. Matrice énergétique du Brésil pour l'année 2010 (<http://sugarcane.org/>).
La canne à sucre fournit, à elle seule, près de 18% des besoins énergétiques du Brésil.

1.2 Répartition géographique et importance économique

Limitée par le froid et l'altitude, l'aire de culture de la canne à sucre s'étend de 37° de latitude Nord à 30° de latitude Sud. Cette graminée est une des cultures les plus importantes des régions tropicales et subtropicales. Actuellement, la canne à sucre est cultivée dans plus de 90 pays. Etant donné qu'il s'agit d'une plante en "C4", la canne à sucre est caractérisée par un rendement photosynthétique remarquable et une productivité élevée pouvant atteindre 50 tonnes de matière sèche par hectare et par an. En 2011, la production de canne à sucre a été estimée à 1 600 million de tonnes pour une surface cultivée de 23,8 millions d'hectares. Le Brésil, premier producteur mondial, contribue à lui seul à 40% de la production mondiale (soit 700 millions de tonnes en 2011) (Tableau 8) (<http://faostat.fao.org>).

La canne à sucre est cultivée principalement pour le saccharose qu'elle stocke dans ses tiges et 70% de la production mondiale du sucre de table est fourni par cette plante. En outre, cette culture est à la base d'une agro-industrie très diversifiée. En effet, mis à part le sucre et le rhum, elle génère, à partir de ces sous-produits (dont la bagasse qui est le résidu de broyage des tiges), toute une gamme de produits nombreux et divers concernant la fertilisation agricole, la production d'énergie électrique, l'industrie papetière et chimique, l'industrie de l'alimentation animale, ou encore la production du bioéthanol (utilisé comme carburant) (Scortecci *et al.*, 2012). L'industrie sucrière brésilienne, qui avait pour objectif de s'affranchir de la dépendance pétrolière, est pionnière dans la production de bioéthanol et de bioélectricité à partir de la canne. En 2010, la canne à sucre a fourni près de 18% des besoins énergétiques du Brésil (Figure 28), avec une production de 27 milliards de litres de bioéthanol et environ 2000 mégawatts (<http://sugarcane.org/>). La canne à sucre a donc une très grande importance alimentaire, mais aussi industrielle et économique.

1.3 Description morphologique et anatomique

La canne à sucre, comme toutes les graminées, se présente sous la forme d'une touffe de tiges (encore appelées talles ou repousses) possédant un système racinaire fibreux, de grands épis de fleurs et de longues feuilles (Figure 29A).

Les feuilles de la canne à sucre sont ordinairement insérées de façon alternée au niveau des nœuds de la tige et sont composées de deux parties, la gaine et le limbe foliaire qui sont séparés par une articulation comprenant l'ochréa, la ligule et les auricules (Figure 29B).

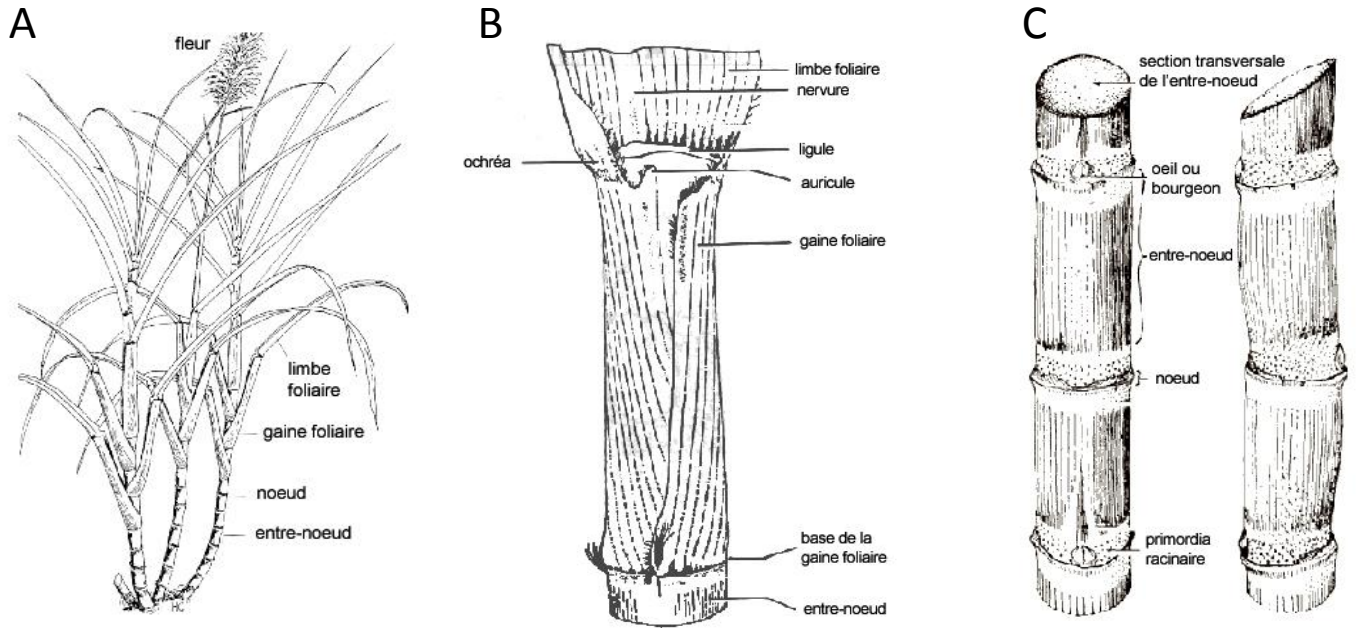


Figure 29. Caractéristiques morphologiques de la canne à sucre. (A) Aspect général d'une tige de canne à sucre. **(B)** Portion d'une feuille de canne montrant les différentes parties qui la composent. **(C)** Portion d'une tige de canne montrant les détails d'un noeud et d'un entre-noeud.

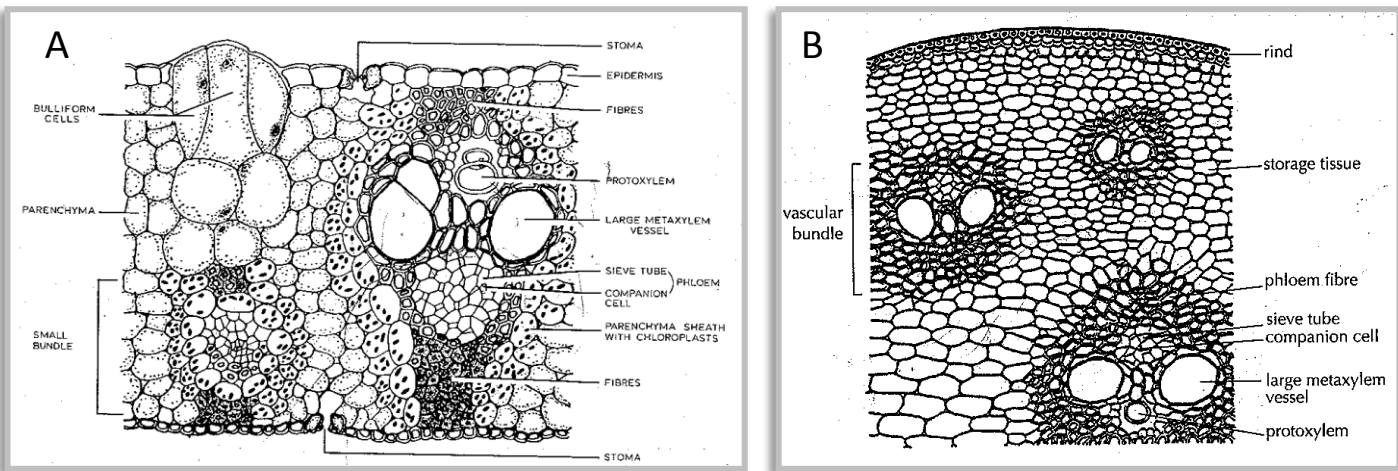


Figure 30. Caractéristiques anatomiques de la canne à sucre (D'après Soupramanien, 2000). (A) Coupe transversale d'une section de feuille de canne à sucre montrant les faisceaux vasculaires et les tissus qui leurs sont associés. **(B)** Coupe transversale d'une section de tige montrant les faisceaux vasculaires et les tissus de stockage.

La gaine, de forme tubulaire, est la partie basse de la feuille qui s'enroule autour de l'entre-nœud. En coupe transversale, le limbe foliaire est constitué de l'épiderme inférieur et de l'épiderme supérieur entre lesquels sont localisés les faisceaux vasculaires ainsi que le parenchyme, encore appelé mésophylle (Figure 30A) (Soopramanien, 2000). Les faisceaux vasculaires sont constitués de deux vaisseaux larges du métaxylème, et d'un vaisseau moins large qui constitue le protoxylème et du phloème. Les faisceaux conducteurs (xylème et phloème) sont entourés d'une couronne de cellules appelées cellules du parenchyme de la gaine périvasculaire. Les cellules du mésophylle ainsi que celles de la gaine périvasculaire sont riches en chloroplastes et jouent ainsi un rôle majeur dans la photosynthèse. Les faisceaux du phloème et du xylème de la gaine foliaire communiquent avec les faisceaux correspondants de la tige au niveau du nœud lorsque les feuilles sont encore jeunes (Blackburn, 1984).

La tige de canne à sucre peut atteindre 2 à 5 mètres de hauteur pour un diamètre variant de 2 à 6 centimètres (Van Dillewijn, 1960). La tige est constituée d'une série de phytomères qui prennent naissance au niveau du méristème végétatif apical au sommet de la tige. Un phytomère est constitué d'un entre-nœud et d'un nœud qui porte la gaine prolongée par le limbe foliaire (Figure 29C). En coupe transversale, une tige de canne à sucre est constituée d'une masse importante de tissu de stockage formé de cellules parenchymateuse, entre lesquelles sont localisées les faisceaux vasculaires (Figure 30B) (Soopramanien, 2000). Les cellules du parenchyme de la tige constituent un réservoir du saccharose. En effet, à maturité, les tiges de la canne à sucre accumulent des concentrations très élevées de sucrose, qui peuvent atteindre 650 mM chez certaines variétés dans les cellules de parenchyme de stockage (Rae *et al.*, 2005).

1.4 Principales maladies de la canne à sucre

La canne à sucre est sujette à environ 60 maladies d'origine bactérienne, virale et fongique (Rott *et al.*, 2000). Ces dernières années, les dégâts les plus importants et les plus fréquemment rencontrés ont été causés par *Puccinia kuehnii*, l'agent causal de la rouille orangée et par *Ustilago scitaminea*, l'agent du charbon de la canne à sucre. De même, certains virus comme le virus de la feuille jaune (*Sugarcane yellow leaf virus*) et le virus de la mosaïque (*Sugarcane mosaic virus*) peuvent également provoquer des pertes conséquentes. Les principales maladies bactériennes sont causées par *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (agent causal

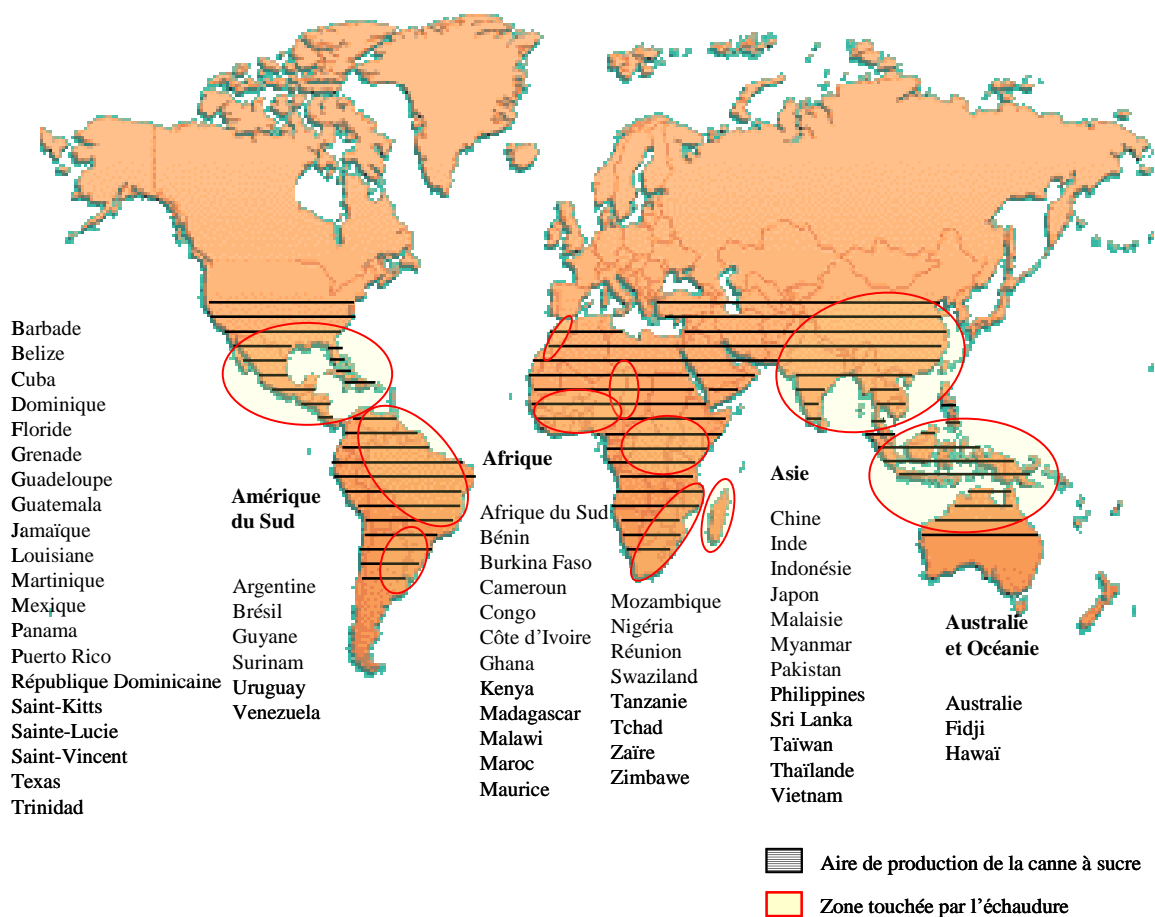


Figure 31. Carte géographique montrant l'aire de production de la canne à sucre et les zones affectées par l'échaudure des feuilles (Rott *et al.*, 1995).

du rabougrissement des repousses), et *Xanthomonas albilineans* (responsable de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre).

2 LA MALADIE : L'ÉCHAUDURE DES FEUILLES DE LA CANNE À SUCRE

2.1 Répartition géographique et importance économique

L'échaudure des feuilles est une des principales maladies bactériennes de la canne à sucre (Ricaud et Ryan, 1989 ; Rott *et al.*, 2000). Cette maladie sévit dans au moins 61 pays de par le monde (Figure 31), et le nombre de zones touchées par la maladie continue de croître (Rott *et al.*, 2000). Ainsi, l'échaudure des feuilles a été signalée très récemment au Gabon (Mensi *et al.*, 2013). La maladie peut être particulièrement destructrice dans certaines conditions, et un climat tropical caractérisé par des épisodes cycloniques favorise son développement (Champoiseau *et al.*, 2009 ; Daugrois *et al.*, 2003 ; Hoy et Grisham, 1994). L'échaudure des feuilles peut provoquer des dégâts très importants, voire une destruction totale des champs de canne à sucre, surtout lorsque des variétés sensibles sont atteintes ou lorsqu'une nouvelle souche de l'agent pathogène est introduite dans une région donnée (Davis *et al.*, 1997). La maladie peut affecter non seulement le rendement en canne à la récolte, mais également la qualité du jus extrait à partir de la tige (Hoy et Grisham, 1994). A titre d'exemple, dans des essais variétaux en Guadeloupe, l'échaudure des feuilles a provoqué une baisse de rendement de l'ordre de 15 à 20% chez des variétés commerciales sensibles (Rott *et al.*, 1995).

2.2 Symptômes de la maladie

Au champ, on distingue deux formes de la maladie : une forme chronique et une forme aiguë. En général, la maladie évolue progressivement de la forme chronique vers la forme aiguë mais ces deux formes peuvent aussi apparaître indépendamment l'une de l'autre. On distingue également deux phases distinctes au cours du développement de la maladie : une phase de latence et une phase d'éclipse (Rott et Davis, 2000).

La forme chronique de la maladie est caractérisée par l'apparition de stries ou lignes chlorotiques foliaires qui sont parallèles à la nervure centrale. Ces stries, de couleur blanche ou jaune, sont en général étroites mais peuvent aussi avoir quelques millimètres de large (Figure 32A). Ces stries constituent le seul symptôme externe observé sur les variétés

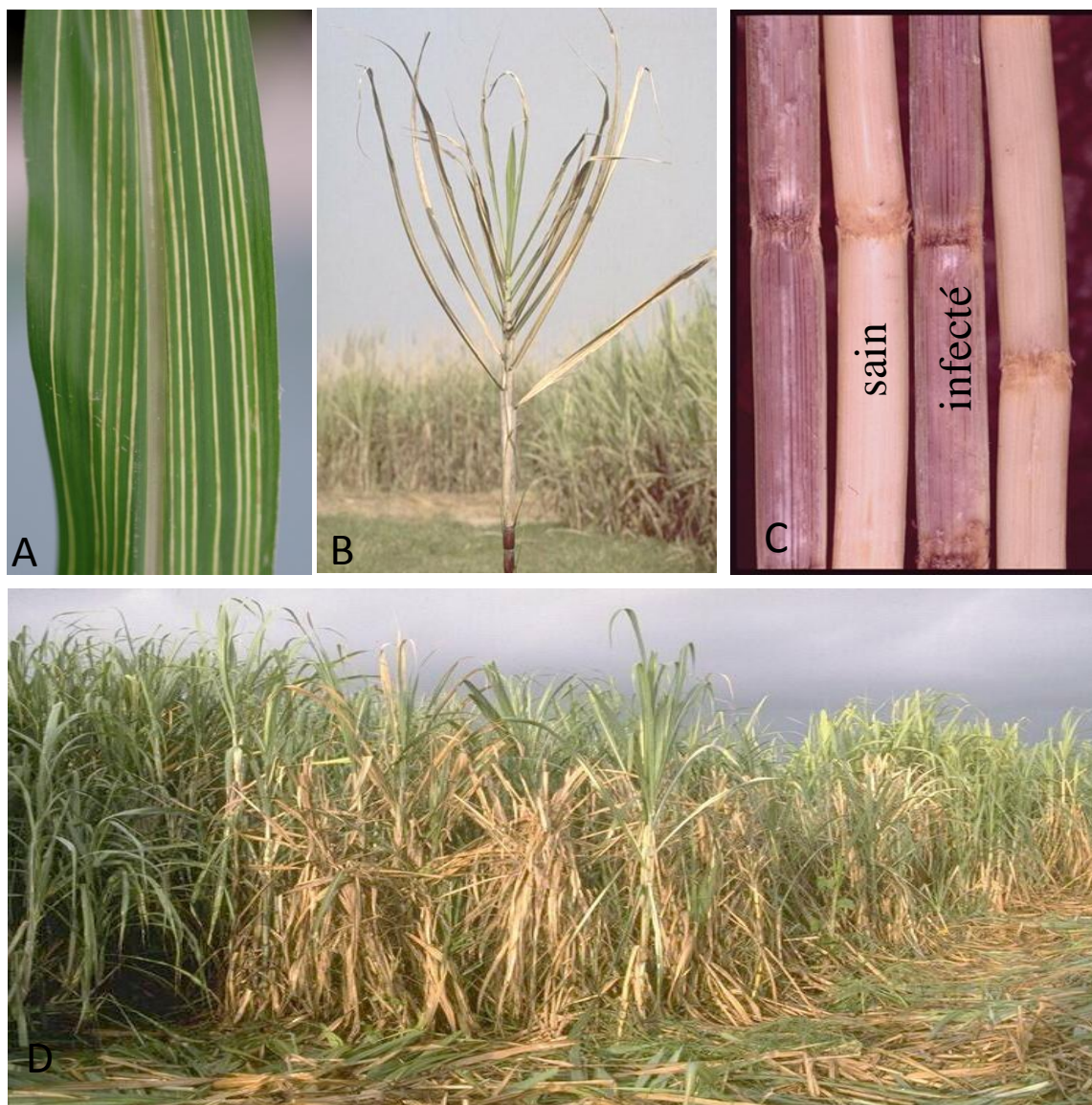


Figure 32. Symptômes d'échaudure des feuilles de la canne à sucre. (A) Stries blanches parallèles à la nervure centrale. **(B)** Aspect échaudé d'une tige de canne infectée montrant le dessèchement des feuilles. **(C)** Coupe longitudinale de tiges montrant des tissus sains et malades (rougissement des faisceaux vasculaires). **(D)** Variété de canne à sucre sensible atteinte de l'échaudure des feuilles au champ (Photos Rott P.).



Figure 33. Symptômes atypiques d'échaudure des feuilles observés suite à une transmission aérienne de l'agent pathogène (Daugrois *et al.*, 2003).

résistantes. Lorsque la maladie évolue, les stries ont tendance à s'élargir et à devenir plus diffuses, notamment sur les feuilles vieillissantes. Cette étape coïncide avec l'apparition de chloroses ou de blanchiments qui peuvent affecter tout le feuillage. Les feuilles se dessèchent ensuite, brunissent et finissent par se recourber vers l'intérieur, donnant à la plante un aspect échaudé, d'où l'appellation «échaudure des feuilles» donnée à la maladie (Figure 32B). Sur les tiges âgées, la forme chronique se manifeste tout particulièrement par le démarrage et le développement des bourgeons axillaires, appelés aussi ailerons, qui peuvent alors présenter les mêmes symptômes que les tiges principales. En section transversale ou longitudinale, la tige malade présente un rougissement caractéristique des faisceaux vasculaires au niveau des nœuds et des entre-nœuds (Figure 32C). Chez les variétés sensibles, le stade ultime de la maladie est la mort de la plante (Figure 32D) (Rott et Davis, 2000).

L'échaudure des feuilles se caractérise également par une phase de latence au cours de laquelle la plante, porteuse de l'agent pathogène, ne présente aucun symptôme visible de la maladie. La phase de latence peut durer plusieurs semaines voire quelques mois et elle prend fin pour des raisons inconnues. La maladie progresse alors rapidement vers sa forme aiguë (Ricaud et Ryan, 1989), qui se manifeste par un dessèchement brusque des cannes matures. Elle se produit en général après un épisode pluvieux suivi d'une période de sécheresse prolongée, et elle semble être limitée aux variétés très sensibles. Les raisons de l'apparition soudaine de la forme aiguë de la maladie restent encore énigmatiques. Cependant, la transition rapide de la maladie de la phase de latence à la forme aiguë est souvent associée à un stress environnemental de la plante qui favoriserait le développement de la maladie (Birch, 2001).

La phase d'éclipse peut coïncider avec la phase de latence. Dans ce cas, les lignes blanches caractéristiques de la maladie apparaissent sur le limbe foliaire et disparaissent suite à la sénescence et la mort des feuilles âgées. Par conséquent, selon la date d'inspection, une plante peut apparaître saine ou infectée (Rott et Davis, 2000).

Des symptômes atypiques de la maladie ont aussi été observés sur les feuilles de canne à sucre en Guadeloupe, en Floride et à Maurice. Ils ont été associés à une transmission aérienne de la bactérie (Comstock, 2001 ; Daugrois *et al.*, 2003 et 2012). Ces symptômes se présentent sous la forme de petites lésions nécrotiques brun-rouge sur le limbe foliaire. Elles sont parallèles aux nervures et le plus souvent prolongées à l'une ou aux deux extrémités par un unique faisceau vasculaire décoloré (Figure 33) qui est semblable aux stries foliaires de la forme chronique de la maladie.

2.3 Mode de transmission de la maladie

Deux modes de transmission de l'échaudure des feuilles sont connus à ce jour, à savoir la transmission mécanique et la transmission aérienne. La transmission mécanique a lieu par l'utilisation d'outils de coupe contaminés et par la plantation de boutures infectées (Ricaud et Ryan, 1989 ; Rott et Davis, 2000). Etant donné que l'échaudure des feuilles peut être latente, ce mode de transmission a considérablement contribué à la propagation de la maladie à travers le monde *via* l'échange de boutures prélevées sur des plantes infectées mais asymptomatiques.

La transmission aérienne de l'échaudure des feuilles a été mise en évidence suite à l'isolement de l'agent pathogène à partir de la canopée de la canne à sucre (Daugrois *et al.*, 2003; Klett et Rott, 1994) et l'observation de symptômes d'échaudure sur des plants de maïs poussant entre les rangs de canne à sucre (Autrey *et al.*, 1995). Ce mode de transmission a été associé à des symptômes foliaires atypiques (Autrey *et al.*, 1995; Comstock, 2001), ainsi qu'à la recrudescence de la maladie dans les années 1980-1990 dans le bassin caribéen (Daugrois *et al.*, 2003 ; Davis *et al.*, 1997; Klett et Rott, 1994).

2.4 Méthodes de lutte

Etant donné que la canne à sucre est principalement cultivée en monoculture sur de grandes surfaces, et que sa multiplication est réalisée par voie végétative (bouturage), elle constitue un terrain particulièrement propice au développement d'épidémies lorsque des variétés sensibles sont utilisées. Les moyens de lutte contre l'échaudure des feuilles se limitent aux mesures prophylactiques et à la création de variétés de canne à sucre résistantes. Les mesures préventives consistent à utiliser du matériel végétal certifié sain afin d'éviter et de limiter la dispersion de l'agent pathogène. Des contrôles sanitaires stricts, faisant appel à des isolements sur milieu sélectif et à des analyses immunologiques et moléculaires, ont été mis en place afin de vérifier l'état phytosanitaire du matériel végétal.

La sélection sanitaire peut également être combinée à d'autres méthodes permettant la production de boutures saines. Pour produire du matériel végétal indemne de maladies, et entre autre indemne d'échaudure des feuilles, le Cirad de Montpellier (zone hors production de canne à sucre) a créé une structure de quarantaine canne à sucre qui fournit des variétés saines dans le monde entier (<http://visacane.cirad.fr/>). Celle-ci, au cours de deux cycles de

quarantaine d'une durée d'un an chacun, a pour objectif de tester, d'assainir et enfin de certifier l'état sanitaire du matériel végétal (Guinet-Brial *et al.*, 2013 ; Rott *et al.*, 1995). L'assainissement du matériel végétal peut être réalisé par la culture *in vitro* et par thermothérapie. La culture *in vitro* permet la production et la multiplication de matériel végétal en laboratoire par la culture de méristèmes apicaux ou de bourgeons latéraux (Feldmann *et al.*, 1994). Dans certaines zones de production sucrière, les vitroplants produits par culture de méristème sont utilisés pour la mise en place de schémas de pépinières. La thermothérapie est une technique qui consiste à traiter les boutures de canne à sucre à l'eau chaude (48 heures à 25°C suivies de 3 heures à 50°C), afin d'éliminer les bactéries susceptibles d'être hébergées par ces boutures. Au champ, cette méthode n'est cependant pas adaptée à la taille des surfaces agricoles à cultiver et son utilisation reste par conséquent limitée aux quarantaines et parfois aux pépinières.

L'utilisation de variétés résistantes est le moyen le plus efficace pour lutter contre l'échaudure des feuilles (Ricaud et Ryan, 1989). Cependant, malgré le développement de variétés de canne à sucre améliorées et sélectionnées pour leur résistance à cette maladie, plusieurs cas d'échaudure des feuilles ont été signalés sur des variétés considérées comme résistantes (Davis *et al.*, 1997 ; Rott et Davis, 2000). Par ailleurs, mises à part la complexité des schémas de sélection et la durée relativement longue de ce procédé (10 à 12 ans en moyenne), la sélection de variétés de canne résistantes à l'échaudure des feuilles est difficile étant donnée l'existence d'une phase de latence. Afin de développer des méthodes de lutte plus efficaces et plus durables contre l'échaudure des feuilles, une connaissance approfondie de son agent causal, *X. albilineans*, est indispensable.

3 L'AGENT CAUSAL : *XANTHOMONAS ALBILINEANS*

3.1 Classification, morphologie et physiologie

Décrit et isolé pour la première fois au début du 20^e siècle (Wilbrink, 1920), l'agent causal de l'échaudure des feuilles a été nommé *Bacterium albilineans* par Ashby (Ashby, 1929). La bactérie a été assignée ensuite à plusieurs genres, notamment aux *Phytomonas*, *Pseudomonas* et *Agrobacterium* (Ricaud et Ryan, 1989). En 1939, le genre *Xanthomonas*, regroupant les bactéries pathogènes de plantes pourvues d'un unique flagelle polaire et produisant un pigment jaune, a été créé par Dowson (van den Mooter et Swings, 1990).

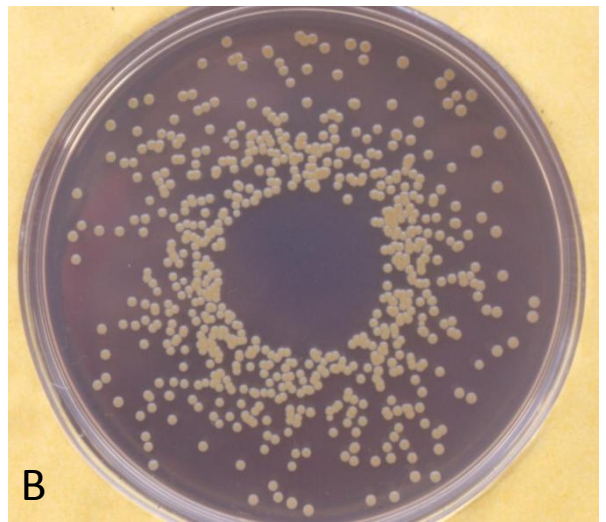


Figure 34. *Xanthomonas albilineans*. (A) Aspect d'une cellule bactérienne en microscopie électronique à transmission en contraste négatif montrant la cellule en forme de bâtonnet allongé et le flagelle polaire unique (Birch, 2001). (B) Aspect de colonies bactériennes sur milieu de culture gélosé (Photo Rott P.).

L'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre est alors nommé *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson (Dowson, 1943). Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet et mobile grâce à un unique flagelle polaire (Figure 34A). Comme la majorité des autres espèces appartenant au genre *Xanthomonas*, *X. albilineans* produit un pigment jaune photo-protecteur et antioxydant à base de caroténoïdes, appelé xanthomonadine (Büttner et Bonas, 2009). L'appellation attribuée à ce genre provient d'ailleurs du mot *Xanthos* qui signifie jaune en grec et *monas* qui veut dire entité. En culture sur milieu gélosé, *X. albilineans* forme des colonies circulaires, convexes, lisses, brillantes et translucides de couleur jaune-miel qui ont tendance à foncer après 5 jours de croissance à 28°C (Figure 34B). De plus, *X. albilineans* se distingue des autres bactéries du genre *Xanthomonas* par (i) une croissance plus lente sur milieu gélosé (4 à 5 jours *versus* 2 à 3 jours pour les autres *Xanthomonas*), (ii) une production très faible voire inexistante d'exopolysaccharides, d'où l'aspect non muqueux de ses colonies sur milieu de culture, et (iii) un spectre caractéristique de résistance aux antibiotiques (van den Mooter et Swings, 1990 ; Vauterin *et al.*, 1993).

Au niveau physiologique, les *Xanthomonas*, et donc *X. albilineans*, ont un métabolisme respiratoire de type aérobie strict. Leur croissance optimale a lieu à des températures comprises entre 25 et 30°C (van den Mooter et Swings, 1990). Les *Xanthomonas* sont catalase positive, oxydase négative ou faiblement positive, indole négative, uréase négative et elles sont incapables de réduire les nitrates en nitrites (Bradbury, 1984).

3.2 Cycle infectieux

La plante hôte principale de *X. albilineans* est la canne à sucre. Cependant, cette bactérie peut aussi survivre sur d'autres Poacées poussant à proximité des plantations de canne à sucre, comme le maïs (*Zea mays*) ou des graminées sauvages telles que *Brachiaria piligera*, *Imperata cylindrica*, *Panicum maximum*, *Paspalum* spp., *Rottboellia cochinchinensis*, etc. (Ricaud et Ryan, 1989). La canne à sucre et ces hôtes alternatifs, lorsqu'ils sont infectés, constituent des sources potentielles d'inoculum pour la dissémination de la bactérie (Orian, 1942 ; Ricaud et Ryan, 1989). En présence de conditions climatiques favorables (pluies, vent), les souches de *X. albilineans* appartenant à un certain groupe génétique (PFGE-B, cf partie 2 paragraphe 3.5) peuvent être transmises par voie aérienne à partir d'un champ de canne à sucre infecté et contaminer des plantes saines (Champoiseau *et al.*, 2009 ; Daugrois *et al.*, 2003 et 2012) (Figure 35).

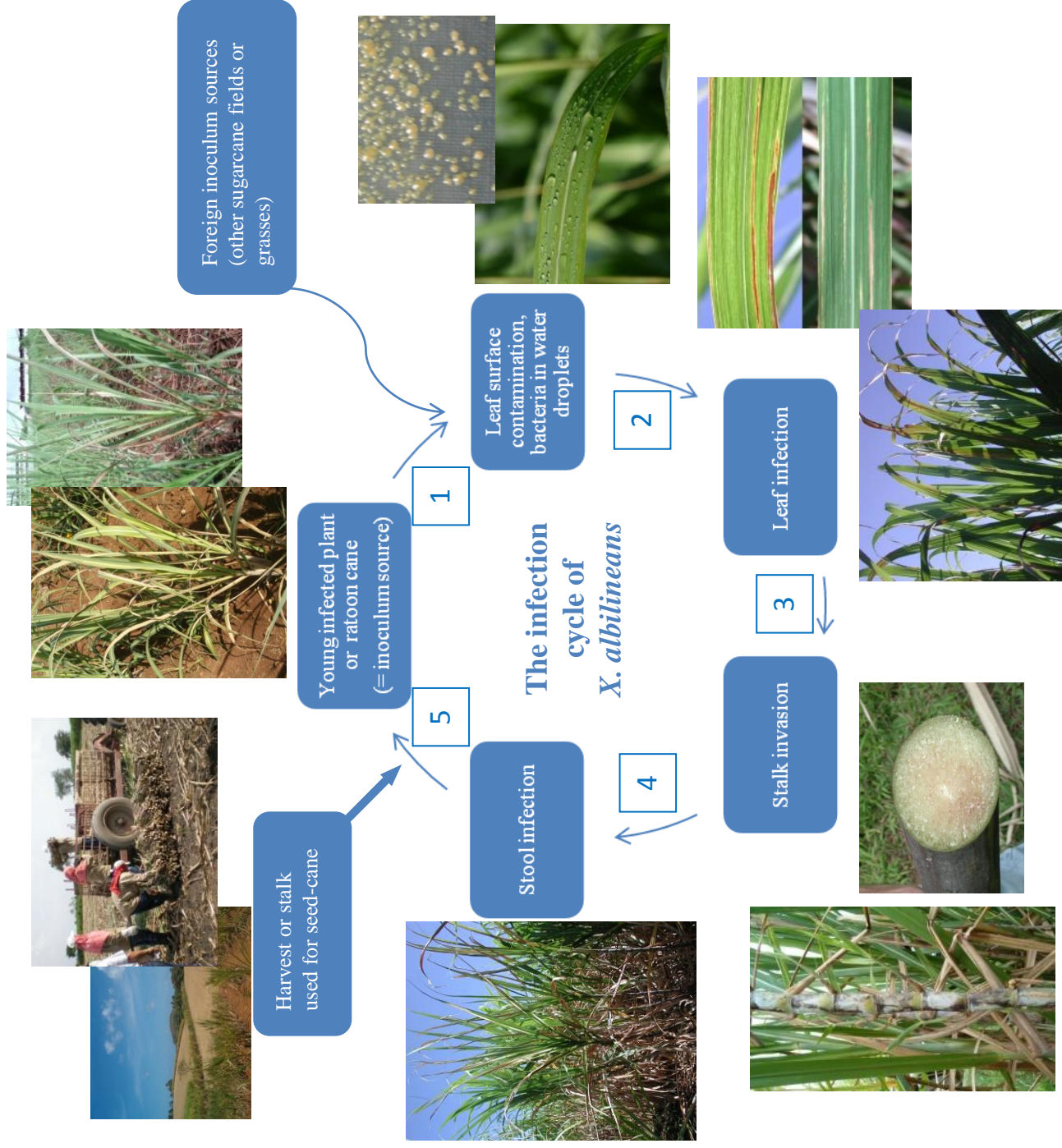


Figure 35. Cycle de vie de *Xanthomonas albilineans* (D'après Daugrois *et al.*, 2012).

Une fois la bactérie transmise par voie aérienne, elle s'installe d'abord à la surface des feuilles de canne à sucre dont elle colonise progressivement la canopée (colonisation épiphyte). Comme la plupart des *Xanthomonas*, *X. albilineans* pénètre ensuite dans la plante probablement par les blessures au niveau des feuilles ou bien *via* les ouvertures naturelles (stomates ou hydathodes). Elle progresse et se multiplie dans les vaisseaux du xylème foliaire, ce qui provoque l'apparition de lignes blanches et de nécroses sur le limbe des feuilles (Figure 35). Le passage de la bactérie de la feuille à la tige par l'intermédiaire des gaines foliaires conduit à une multiplication importante de la bactérie dans le xylème caulinair et à une infection systémique de la plante. Suite à cette infection systémique par l'agent pathogène, les feuilles se dessèchent entièrement, brunissent et se courbent vers l'intérieur, ce qui donne à la plante un aspect échaudé (Figure 35). Chez les variétés sensibles, le stade ultime de la maladie est la mort de la plante (Rott et Davis, 2000).

Les principaux modes de dissémination de *X. albilineans* sont l'utilisation d'outils de coupes contaminés ou la plantation de boutures infectées prélevées à partir de cannes malades mais asymptomatiques (Figure 35) ; dans ce cas, il s'agit d'une contamination systémique de la plante. Lors d'une contamination systémique, *X. albilineans* colonise d'abord le système vasculaire de la plante et exsude ensuite à la surface des feuilles infectées, d'où sa présence dans les gouttelettes de rosée en surface des feuilles infectées (Daugrois *et al.*, 2012 ; Klett et Rott, 1994). Les populations bactériennes exsudées constituent alors une source d'inoculum pour le cycle infectieux suivant et peuvent servir à la dissémination de *X. albilineans* par voie aérienne (la transmission aérienne n'a, à ce jour, été décrite que pour les souches de *X. albilineans* du groupe génétique PFBE-B) (Daugrois *et al.*, 2012 ; Klett et Rott, 1994; Sordi et Tokeshi, 1986). Il est à signaler que ce phénomène d'exsudation et la dissémination aérienne de *X. albilineans* n'ont été découverts que récemment et, pendant longtemps, la transmission par boutures et la transmission par les outils contaminés ont été considérées comme uniques voies de dissémination de la bactérie. A ce jour, la dissémination par voie aérienne n'a été rapportée que dans trois zones géographiques : la Guadeloupe (Daugrois *et al.*, 2003), la Floride (Comstock, 2001), et l'île Maurice (Autrey *et al.*, 1995).

Les conditions climatiques favorables à la dissémination de *X. albilineans* par voie aérienne sont présentes dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales caractérisées par des épisodes cycloniques, comme c'est le cas en Guadeloupe (Daugrois *et al.*, 2003 et 2012). La pluie est un facteur crucial et indispensable pour la réussite de la dispersion aérienne de la bactérie. En effet, il a été montré au champ que l'augmentation des populations

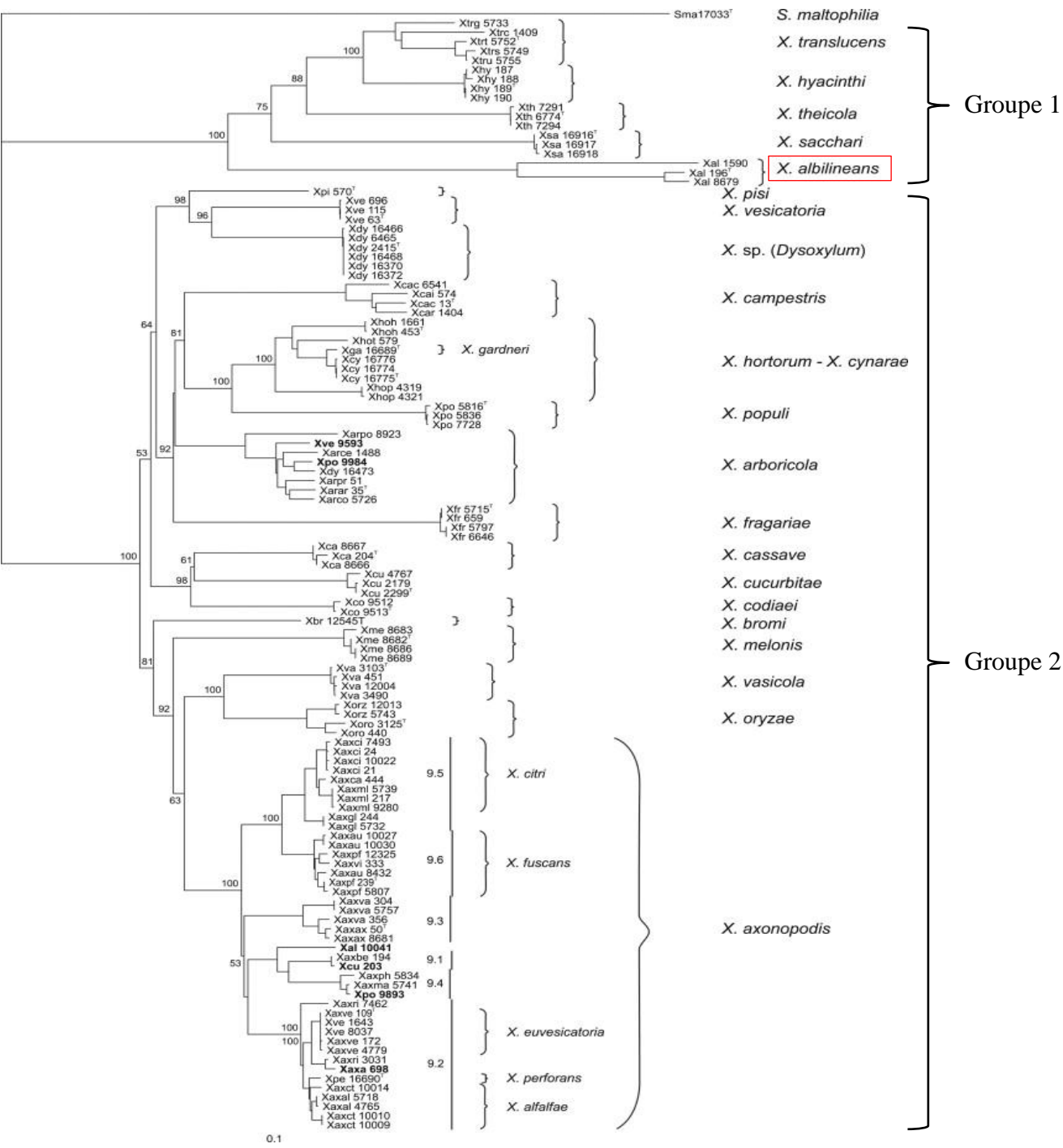


Figure 36. Arbre phylogénétique construit sur la base des séquences partielles concaténées des gènes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* et *rpoD* de 119 souches de *Xanthomonas* (Young et al., 2008). *X. albilineans* forme avec *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. hyacinthi* et *X. translucens* un groupe minoritaire (groupe 1), alors que le groupe 2 renferme la majorité des espèces de *Xanthomonas*. La barre indique le nombre de substitutions nucléotidiques par site.

de *X. albilineans* en surface des feuilles est corrélée avec la quantité de précipitations (Champoiseau *et al.*, 2009, Daugrois *et al.*, 2012). De plus, il y a une corrélation entre le nombre de tiges infectées (suite à une dissémination aérienne) et la quantité de pluies lorsque la valeur de pluies cumulées atteint et dépasse 1250 mm (Daugrois *et al.*, 2012).

X. albilineans a été aussi trouvée dans le sol et les racines de la canne à sucre, mais l'importance de cette localisation dans les parties souterraines reste à préciser (Klett et Rott, 1994). Ces auteurs suggèrent que la bactérie peut être transmise d'une plante à l'autre *via* les contacts entre systèmes racinaires.

3.3 *Xanthomonas albilineans* : une bactérie particulière et originale au sein du genre *Xanthomonas*

3.3.1 Position phylogénétique particulière

Le genre *Xanthomonas* regroupe actuellement 27 espèces de bactéries phytopathogènes et au moins 120 pathovars (Bull *et al.*, 2010). Les *Xanthomonas* appartiennent à la subdivision gamma des *Proteobacteriae* et à la famille des *Xanthomonadaceae*. Une étude phylogénétique de type « Multi Locus Sequence Analysis » (MLSA) utilisant quatre gènes de ménage (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* et *rpoD*), et réalisée avec une collection de 119 souches représentatives du genre *Xanthomonas*, a permis de montrer que le genre *Xanthomonas* se répartit en deux groupes génétiques distincts et inégaux en taille (Young *et al.*, 2008). *X. albilineans* forme avec *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. hyacinthi* et *X. translucens* un groupe minoritaire (groupe 1), alors que le groupe 2 renferme la majorité des espèces à savoir *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. codiae*, *X. cucurbitae*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. melonis*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. populi*, *X. vasicola* et *X. vesicatoria* (Figure 36). Ces groupes correspondent également à ceux basés sur des séquences partielles de l'ADN ribosomal 16S (Hauben *et al.*, 1997) et sur des séquences intergéniques 16S-23S (Goncalvez et Rosato, 2002). Ces résultats ont conduit à suggérer que le genre *Xanthomonas*, tel qu'il est actuellement défini, pourrait en fait représenter deux genres distincts (Hauben *et al.*, 1997 ; Young *et al.*, 2008). *X. albilineans* se distingue donc clairement de la majorité des *Xanthomonas*. Récemment, deux nouvelles espèces bactériennes (NCPPB1131 et NCPPB1132) isolées à partir du bananier et d'un insecte prélevé sur bananier ont été assignées au groupe 1, et celles-ci sont aussi phylogénétiquement proches de

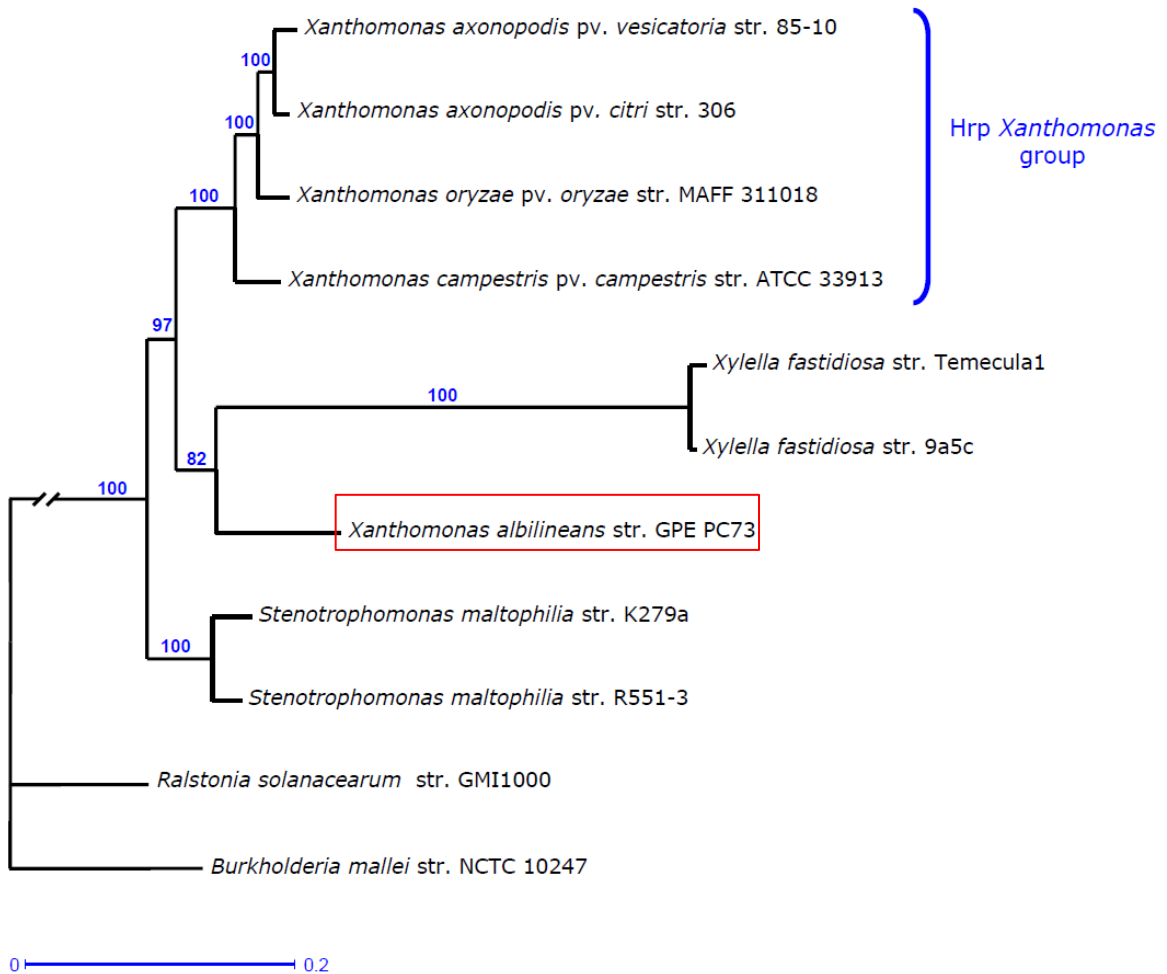


Figure 37. Arbre phylogénétique construit sur la base des séquences concaténées de sept gènes de ménage (*gyrB*, *atpD*, *dnaK*, *efp*, *groEL*, *glnA* et *recA*) de neuf *Xanthomonadaceae* (d'après Pieretti *et al.*, 2009). Les valeurs mentionnées en bleu au niveau des ramifications correspondent aux valeurs de bootstrap exprimées en pourcentage. L'échelle en bas de la figure (0,2) indique le nombre de substitutions nucléotidiques par site.

Tableau 9. Caractéristiques génomiques de certaines bactéries du genre *Xanthomonas* (Ryan *et al.*, 2011).

Species	Pathovar	Strain	Strain or pathovar abbreviation	Host	Disease	Genome size (Mb)	Plasmids
<i>Xanthomonas albilineans</i>	ND	GPE PC73	Xal	Sugarcane	Leaf scald	3.77	Three
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	<i>phaseoli</i>	ND	Xap	Beans	Bacterial blight	NA	None
	<i>manihotis</i>	ND	Xam	Cassava	Bacterial blight	NA	None
<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>campestris</i>	ATCC 33913	Xcc	Crucifers	Black rot	5.08	None
		8004	Xcc	Crucifers	Black rot	5.15	None
		B100	Xcc	Crucifers	Black rot	5.10	None
	<i>armoraciae</i> [‡]	756C	Xca	Crucifers	Leaf spot	4.94	None
	<i>musacearum</i>	NCPPB4381	Xvm	Banana	Enset wilt	4.88	None
	<i>vasculorum</i>	NCPPB702 [¶]	Xvv	Sugarcane	Gumming disease	5.40	None
<i>Xanthomonas citri</i>	<i>citri</i> [¶]	306	Xac	Citrus	Citrus canker	5.27	pXAC64 and pXCC33
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> [*]	ND	85-10	Xcv	Tomato and pepper	Leaf spot	5.42	pXCV38, pXVC2, pXCV19 and pXCV183
<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>	ND	ICPB 11122	Xaub	Citrus	Citrus canker	4.70	None
		ICPB 10535	Xauc	Citrus	Citrus canker	5.00	None
<i>Xanthomonas oryzae</i>	<i>oryzae</i>	KACC10331	Xoo	Rice	Bacterial blight	4.94	None
		PXO99A	Xoo	Rice	Bacterial blight	5.20	None
		MAFF 311018	Xoo	Rice	Bacterial blight	4.94	None
		AX01947	Xoo	Rice	Bacterial blight	5.10	None
	<i>oryzicola</i>	BLS256	Xoc	Rice	Bacterial streak	4.80	None

X. albilineans et de *X. sacchari* (bactérie non pathogène isolée à partir de la canne à sucre) (Studholme *et al.*, 2011 et 2012).

Par ailleurs, une autre étude MLSA réalisée à l'aide des séquences de 7 gènes de ménage de 9 *Xanthomonadaceae* a permis de montrer que *X. albilineans* descend du même ancêtre que *Xylella fastidiosa* (Figure 37) (Pieretti *et al.*, 2009). Cependant, même si *Xylella fastidiosa* et *X. albilineans* descendent d'un parent commun, parent qui ne serait pas partagé avec *X. vesicatoria*, *X. oryzae*, *X. campestris* et *S. maltophilia*, *X. albilineans* est plus proche des autres *Xanthomonas* que de *Xylella fastidiosa* (Pieretti *et al.*, 2009).

3.3.2 Caractéristiques du génome de *X. albilineans*

Récemment, le génome complet d'une souche pathogène de *X. albilineans*, la souche GPE PC73 originaire de Guadeloupe, a été séquencé et annoté (Pieretti *et al.*, 2009). Ce travail a permis, d'une part, de révéler que la taille du chromosome de cette souche (3,77 Mb) est réduite par rapport à celle du chromosome des onze espèces du genre *Xanthomonas* dont la séquence est actuellement disponible (environ 5 Mb) (Tableau 9). Trois plasmides ont été identifiés dans le génome de cette espèce bactérienne et leur taille est respectivement de 25, 27 et 32 Kb. Le génome de *X. albilineans* ne contient que 3115 gènes mais son contenu en GC (63%) est équivalent à celui des autres *Xanthomonas*. *X. albilineans* possède cependant des caractéristiques particulières par rapport aux autres espèces du genre *Xanthomonas* (Pieretti *et al.*, 2009 et 2012). En effet, c'est la seule espèce au sein de ce genre qui a un génome aussi réduit et une artillerie réduite. Elle possède également des séquences codantes qui lui sont uniques. Ces particularités sont étayées ci-dessous.

3.3.2.1 Un génome réduit

De même que *Xylella fastidiosa*, *X. albilineans* a subi une érosion importante de son génome au cours de sa spéciation. Cette évolution s'est traduite par la perte d'au moins 592 gènes, dont 131 potentiellement perdus par pseudogénisation (Pieretti *et al.*, 2009). Parmi les gènes perdus, il y a des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire et dans la régulation transcriptionnelle (Pieretti *et al.*, 2009). L'érosion du génome chez *X. albilineans* a été attribuée à la localisation stricte de la bactérie dans le xylème de la canne à sucre. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer le lien entre l'érosion du génome et la pathogénie de *X. albilineans*. La première est liée à la diminution du taux de multiplication (croissance)

Tableau 10. Facteurs de pathogénie présents ou absents dans le génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* (D'après Pieretti *et al.*, 2009 et 2012).

Facteurs de pathogénie	Présence/Absence
Les gènes <i>gum</i>	-
Les systèmes de régulation à deux composantes	+
Les transporteurs TonB-dependant	+
Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire	+
Les polysaccharides/lipopolysaccharides	+
Le flagelle polaire	+
Les pilus de type I et IV	+
Les protéines d'adhésion non fibrillaires	+
Signalisation cellulaire	
Gènes <i>rpf</i>	+
Gènes <i>pig</i>	+
Les systèmes de sécrétion	
Système de sécrétion de type I (SST1)	+
Système de sécrétion de type II (SST2) Xps	+
Système de sécrétion de type II (SST2) Xcs	-
Système de sécrétion de type III Hrp (SST3)	-
Système de sécrétion de type III SPI-1	+
Système de sécrétion de type IV (SST4)	+
Système de sécrétion de type V (SST5)	+
Système de sécrétion de type VI (SST6)	-
Les effecteurs de virulence ou d'avirulence	
Effecteurs de type III Hrp	-
Effecteurs sécrétés par le SST1	?
Effecteurs sécrétés par des pompes à efflux	?
Phytotoxines et autres molécules NRPS	+
Autres	?

qui, chez les bactéries, est souvent associée à l'érosion du génome. Cette faible croissance conduirait à n'obstruer qu'un faible nombre de vaisseaux et retarder ainsi la mort de la plante. La deuxième propose que la perte de certains gènes, comme ceux codant des MAMPs, permettrait à la bactérie d'échapper plus facilement aux mécanismes de défense de la canne à sucre (Pieretti *et al.*, 2009).

3.3.2.2 Une artillerie réduite

Les facteurs de pathogénie et les systèmes de sécrétion connus à ce jour chez les bactéries du genre *Xanthomonas* et conservés chez *X. albilineans* sont présentés dans le tableau 10. Deux déterminants moléculaires majeurs de l'artillerie des *Xanthomonas* s'avèrent absents chez *X. albilineans*. En effet, contrairement à la majorité des *Xanthomonas*, cette espèce bactérienne ne possède pas de système de sécrétion de type III Hrp. Ce système de sécrétion est également absent chez *X. sacchari* (Studholme *et al.*, 2011) et chez la bactérie polyphage *Xylella fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000). Par ailleurs, *X. albilineans* ne dispose pas non plus des gènes de biosynthèse de la gomme xanthane (gènes *gum*) qui sont impliqués chez d'autres espèces de *Xanthomonas* et chez *Xylella fastidiosa* dans la formation de biofilms, structures bactériennes dont le rôle est crucial dans la pathogénie des bactéries phytopathogènes (Danhorn et Fuqua, 2007 ; Dow *et al.*, 2003 ; Koczan *et al.*, 2009).

De plus, contrairement à certaines espèces du genre *Xanthomonas* qui possèdent deux systèmes de sécrétion de type II (SST2) codés par les clusters *xps* et *xcs*, *X. albilineans* ne possède que le cluster SST2 Xps. Ces systèmes permettent la sécrétion dans le milieu extracellulaire de toxines, d'enzymes extracellulaires (protéases, lipases) ainsi que des enzymes de dégradation des parois cellulaires (Jha *et al.*, 2005). L'implication du SST2 Xps dans la pathogénie des bactéries phytopathogènes a été bien étudiée, alors que celui du SST2 Xcs reste encore à élucider (Jha *et al.*, 2005 ; Ryan *et al.*, 2011 ; Szczesny *et al.*, 2010). *X. albilineans* est aussi dépourvue du système de sécrétion de type VI (SST6). Ce système de sécrétion permet à une bactérie de délivrer des protéines effectrices aussi bien dans les cellules eucaryotes que dans les cellules procaryotes. Il est présent chez des bactéries à Gram-négatif dont les *Xanthomonas* (Silverman *et al.*, 2012). Le SST6 est fortement impliqué dans la pathogénie des bactéries pathogènes de mammifères car il est nécessaire pour réguler l'interaction et la compétition entre espèces bactériennes (Hood *et al.*, 2010 ; Russel *et al.*, 2011).

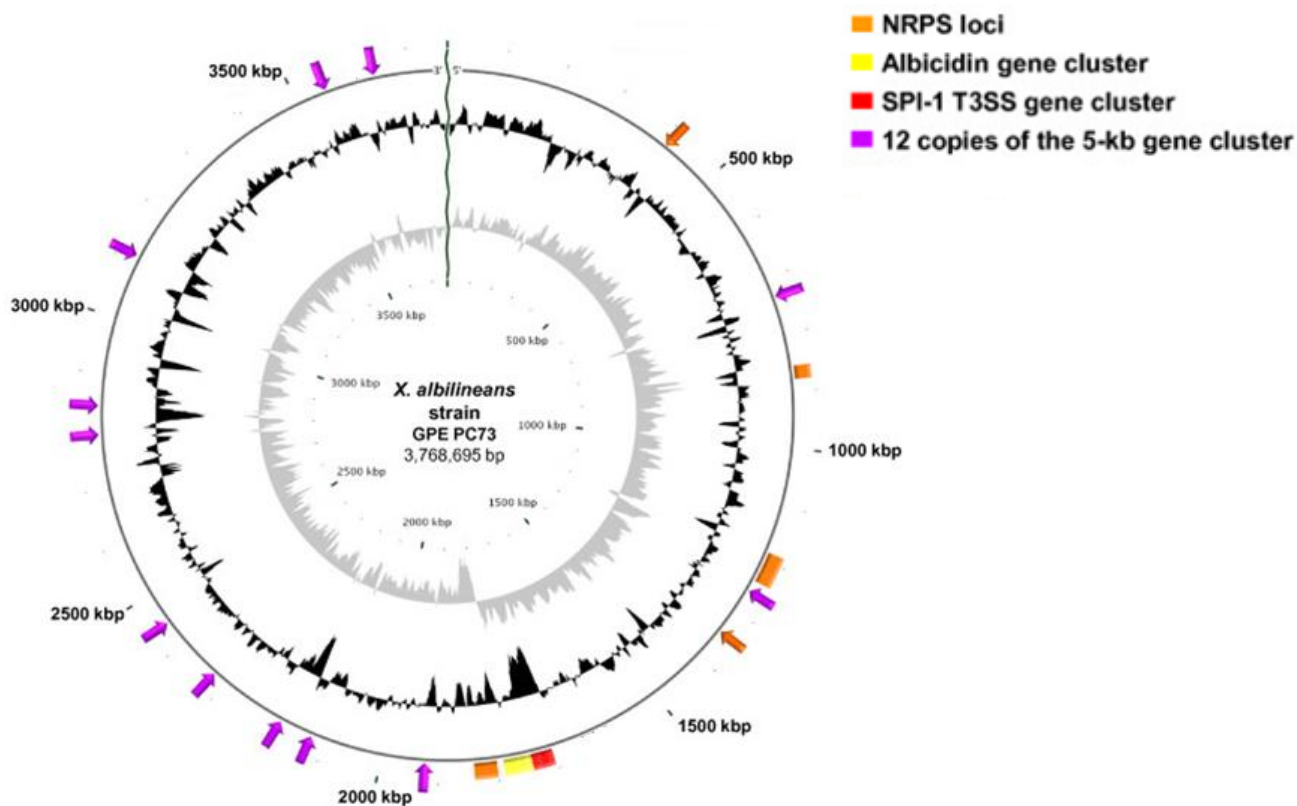


Figure 38. Présentation circulaire du chromosome de *X. albilineans* (souche GPE PC73) (Pieretti *et al.*, 2012). Les boîtes représentent les groupements de gènes qui sont spécifiques à *X. albilineans*: le cluster de biosynthèse de l'albicidine (en jaune); les autres clusters NRPSs (en orange), les gènes du SST3 SPI-1 (en rouge). Les flèches représentent 12 copies d'une région de 5 kb présente dans 12 loci différents (en violet).

3.3.2.3 Des séquences codantes particulières

Bien qu'elle ait un génome réduit, *X. albilineans* possède 522 gènes qui ne sont pas conservés chez les autres bactéries du genre *Xanthomonas* (Pieretti *et al.*, 2009 et 2012). Ces gènes sont impliqués dans la biosynthèse de molécules dont le rôle dans la pathogénie a déjà été montré ou qui reste à identifier. Les principaux gènes ou groupements de gènes uniques (spécifiques) à cette espèce bactérienne sont (Figure 38): (i) un cluster de gènes codant un SST3 de la famille SPI-1 (pour « *Salmonella* Pathogenicity Island-1 »), (ii) douze gènes codant des mégaenzymes NRPS (pour « **N**on **R**ibosomal **P**eptide **S**ynthetase »), (iii) cinq gènes codant des enzymes de dégradation de la paroi possédant un long linker inhabituel, et (iv) une région de 5 kb présente dans 12 loci différents et codant des protéines hypothétiques de fonction inconnue. Les caractéristiques de ces gènes sont présentées ci-dessous.

3.3.2.3.1 Le système de sécrétion de type III de la famille SPI-1

L'absence du SST3 Hrp chez *X. albilineans* laisse supposer que l'interaction entre la bactérie et les cellules de la canne à sucre est réalisée *via* d'autres systèmes de sécrétion. Effectivement, *X. albilineans* possède un système de sécrétion de type III de la famille des injectisomes SPI-1 (Marguerettaz *et al.*, 2011; Pieretti *et al.*, 2009). Ce système de sécrétion, qu'on rencontre habituellement chez les bactéries pathogènes de mammifères ou chez les bactéries symbiotiques d'insectes, est présent chez un nombre très restreint de bactéries phytopathogènes comme par exemple *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Alavi *et al.*, 2008; Marguerettaz *et al.*, 2011; Smits *et al.*, 2010).

Les caractéristiques génomiques et évolutives de ce système de sécrétion ont été récemment décrites par Marguerettaz *et al.* (2011). D'un point de vue évolutif, en se basant sur les séquences du SST3 SPI-1 de bactéries associées aux mammifères, insectes ou plantes, le SST3 SPI-1 de *X. albilineans* fait partie du même groupe génétique que celui des bactéries phytopathogènes qui possèdent ce système (*Erwinia tasmaniensis*, *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, et *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*). Par ailleurs, le SST3 SPI-1 de *X. albilineans* ne présente pas de similarité élevée avec les autres SST3 SPI-1 dont la séquence complète est disponible à ce jour. Il est cependant complet et potentiellement fonctionnel (Marguerettaz *et al.*, 2011). Les séquences partielles du SST3 SPI-1 de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* présentent plus de 77% d'identité en acides nucléiques avec les séquences du SST3 SPI-1 de *X. albilineans*.

Chez *X. albilineans*, le rôle du SST3 SPI-1 est encore non élucidé. En effet, l'étude de deux mutants d'insertion a permis de montrer que ce système de sécrétion n'est pas indispensable pour la colonisation de la canne à sucre et la production de symptômes foliaires (Marguerettaz *et al.*, 2011). Ce système de sécrétion pourrait, en revanche, être nécessaire lors des interactions entre *X. albilineans* et un insecte, comme c'est le cas pour *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, l'agent causal du flétrissement de Stewart chez le maïs (Correa *et al.*, 2010). Cependant, aucun insecte vecteur n'a encore été identifié pour l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. On peut aussi émettre l'hypothèse que le SST3 SPI-1 de *X. albilineans* joue un rôle *hors planta*, notamment lors de la colonisation épiphyte de la plante hôte par l'agent pathogène, comme cela a été suggéré pour *E. tasmaniensis* (Kube *et al.*, 2008).

3.3.2.3.2 Les mégaenzymes NRPS "Non-Ribosomal Peptide Synthetases"

Les NRPS sont des mégaenzymes impliquées dans la biosynthèse non ribosomale de petites molécules. Ces petites molécules peuvent contribuer à la virulence, à l'adaptation à des environnements hostiles, ou jouer un rôle lors de la compétition avec d'autres microorganismes (Groll *et al.*, 2008 ; Mossialos *et al.*, 2002). Le génome de *X. albilineans* comporte 12 gènes codant des enzymes NRPS, et ceux-ci couvrent 4% de la taille du génome de la bactérie (Pieretti *et al.*, 2009). Parmi les 12 gènes NRPS de *X. albilineans*, trois sont impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine, une toxine unique à cette bactérie (Royer *et al.*, 2004). Le rôle des 9 autres gènes NRPS dans le cycle de *X. albilineans* reste, cependant, inconnu (Royer *et al.*, accepté). Selon Marguerettaz (2010), au moins deux petites molécules synthétisées par les gènes NRPS de *X. albilineans*, dont l'albicidine, sont impliquées dans la capacité de cette bactérie à produire des symptômes foliaires et à se multiplier dans la tige de la canne à sucre.

a) L'albicidine : une phytotoxine unique et spécifique à *X. albilineans*

X. albilineans est connue pour produire un complexe de phytotoxines dont la composante majeure est l'albicidine. La caractérisation chimique et structurale de cette toxine est en cours au sein de notre équipe. L'albicidine est une petite molécule dont la masse est estimée à 843 Da (Birch et Patil, 1985). La biosynthèse de cette toxine est sous la dépendance d'un groupement de 20 gènes (*albI* à *albXX*) qui sont situés dans une région de 49 kb du

génomique de la bactérie. Trois de ces gènes codent des mégaenzymes de la famille des NRPSs et des PKS (pour « **Polyketide Synthase** ») (Royer *et al.*, 2004).

L'albicidine représente un élément important du pouvoir pathogène de *X. albilineans* (Birch, 2001 ; Birch et Patil, 1987a). En effet, cette toxine est associée à l'apparition de symptômes foliaires de l'échaudure des feuilles, notamment les lignes blanches et les chloroses foliaires (Birch et Patil, 1987a). Elle inhibe la réplication de l'ADN des proplastides, ce qui bloque par conséquent la différenciation de ceux-ci en chloroplastes (Birch et Patil, 1987b). Au niveau moléculaire, l'albicidine est un puissant inhibiteur de l'ADN gyrase des organismes procaryotes et des chloroplastes (Hashimi *et al.*, 2007). L'albicidine possède également une activité antibiotique à des concentrations nanomolaires sur une large gamme de bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cette activité antibiotique doit conférer à *X. albilineans* un avantage compétitif lors de la colonisation de sa plante hôte (Birch et Patil, 1985).

Jusqu'à récemment, l'albicidine constituait le seul facteur de pathogénie connu chez *X. albilineans*. Cependant, des mutants de *X. albilineans* ne produisant plus d'albicidine sont toujours capables de coloniser efficacement la canne à sucre (Birch, 2001; Birch et Patil, 1987a). Par ailleurs, un mutant non producteur d'albicidine de la souche XaFL07-1 de *X. albilineans* (originaire de Floride) est toujours capable de produire des lignes blanches diffuses et des nécroses foliaires (Rott *et al.*, 2011). De même, un mutant du gène *albi* de la souche *X. albilineans* GPE PC73 (originaire de Guadeloupe) ne produit plus d'albicidine mais colonise de façon efficace les feuilles et la tige de canne à sucre (Marguerettaz, 2010). L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer que **la pathogénie de *X. albilineans* ne repose que partiellement, et non pas essentiellement, sur l'albicidine.**

b) Les autres petites molécules produites par les NRPS

Chez *X. albilineans*, les neuf autres gènes NRPS (qui ne sont pas impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine) sont aussi pressentis comme étant impliqués dans la production de petites molécules. Sept de ces neuf gènes NRPS de *X. albilineans* présentent des similarités avec les gènes NRPS d'autres *Xanthomonas* spp. associés à des monocotylédones (à savoir *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *orizicola* et *X. translucens*) (Royer *et al.*, 2013). Les petites molécules synthétisées par ces gènes NRPSs pourraient être impliquées dans l'interaction spécifique entre ces bactéries et leur plante hôte. En effet, elles pourraient jouer le rôle

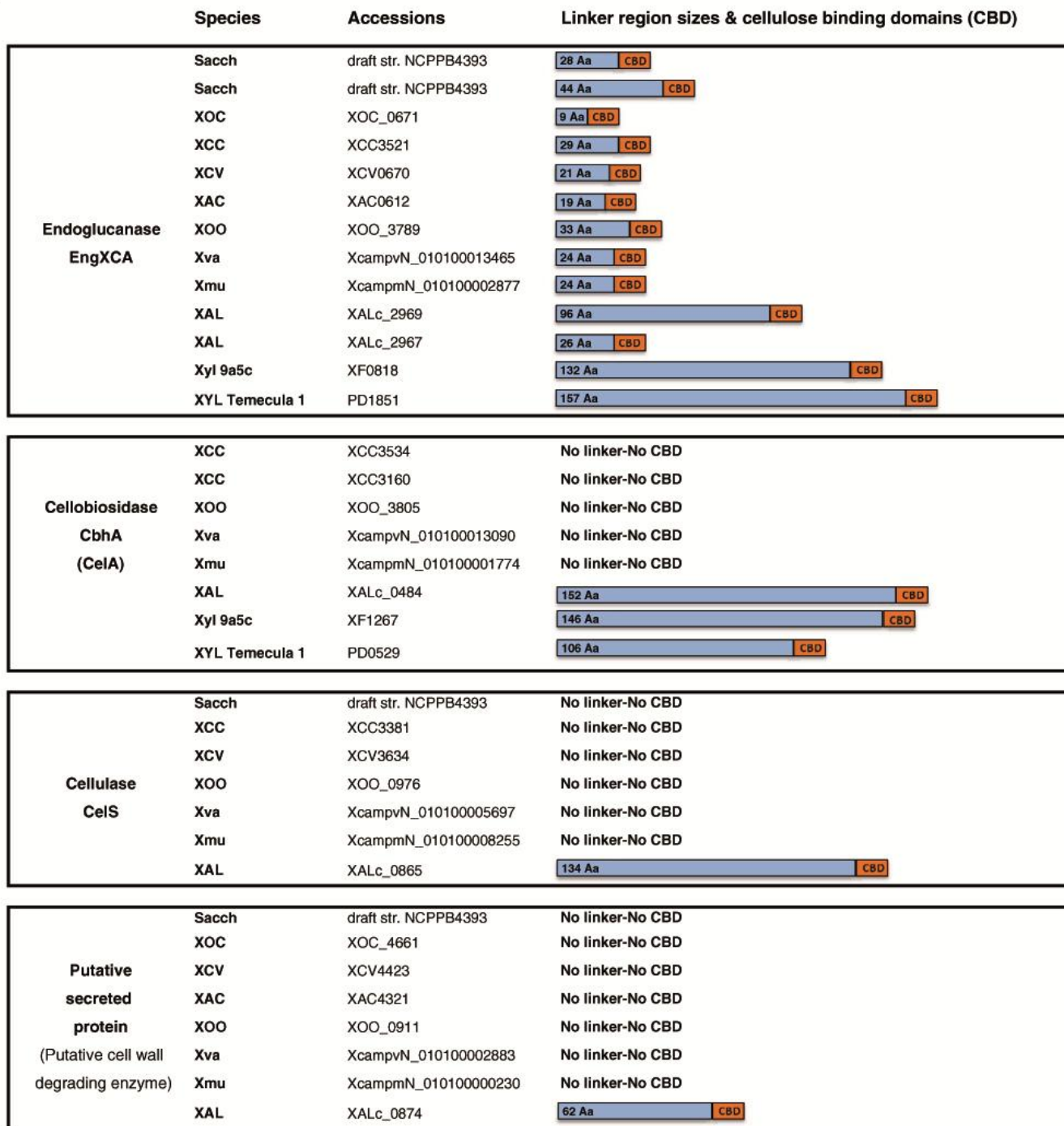


Figure 39. Comparaison des 5 enzymes PCWDE codées par *X. albilineans* et par d'autres espèces de *Xanthomonadaceae* (Pieretti *et al.*, 2012). Les boîtes bleues correspondent au linker (une séquence riche en proline, thréonine, sérine et glycine). La longueur de ces boîtes est proportionnelle à la longueur du linker considéré (le nombre d'acides aminés Aa est indiqué dans chacune des boîtes). Les boîtes oranges correspondent au domaine de fixation à la cellulose (CBD). XOC: *X. oryzae* pv. *oryzicola* souche BLS256; XCC: *X. campestris* pv. *campestris* souche ATCC 33913; XCV: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* souche 85-10; XAC: *X. axonopodis* pv. *citri* souche 306; XOO: *X. oryzae* pv. *oryzae* souche MAFF 311018; Xva: *X. campestris* pv. *vasculorum* souche NCPPB702; Xmu: *X. campestris* pv. *musacearum* souche NCPPB4381; XAL: *X. albilineans* souche GPE PC73; Xyl 9a5c: *X. fastidiosa* souche 9a5c; XYL Temecula 1: *X. fastidiosa* souche Temecula 1.

d'effecteurs ou d'éliciteurs, comme c'est le cas de la syringoline chez *P. syringae* (Waspi *et al.*, 1998).

Ces petites molécules pourraient également jouer le rôle de surfactant (Berti *et al.*, 2007) ou être impliquées dans la biosynthèse de sidérophores (Mossialos *et al.*, 2002).

Un des gènes clés de la biosynthèse des NRPS, à savoir le gène *albXXI*, code une phosphopantéthéinyl transférase qui est une enzyme impliquée dans l'activation post-transcriptionnelle des NRPS, et notamment dans la biosynthèse de l'albicidine (Marguerettaz, 2010). L'inactivation de ce gène par délétion a permis de montrer que les produits des gènes NRPS (notamment les molécules non-albicidine) sont impliqués dans la multiplication de *X. albilineans* dans la partie supérieure de la tige, mais pas dans sa partie inférieure ou dans les feuilles (Marguerettaz, 2010). **Les molécules produites par les gènes NRPS sont donc de nouveaux déterminants du pouvoir pathogène de *X. albilineans*.** Leur rôle précis dans la pathogénie, et notamment la multiplication optimale de la bactérie au sommet de la tige, reste à préciser.

3.3.2.3.3 Les enzymes de dégradation de la paroi végétale

Le génome de *X. albilineans* comporte 19 gènes codant des enzymes de dégradation de la paroi végétale (cellulases, polygalacturonases, rhamnogalacturonases, beta-glucosidases, xylanases) appelées PCWDE (pour « **P**lant **C**ell **W**all **D**egrading **E**nzymes »). Cinq PCWDE codées par *X. albilineans* (à savoir deux endoglucanases EngXCA, une cellobiosidase CbhA ou CelA, une cellulase CelS et une protéine hypothétique sécrétée) possèdent dans leur région C-terminale un très long linker riche en sérine, proline, thréonine ou glycine et un domaine de fixation à la cellulose (CBD) (Figure 39) (Pieretti *et al.*, 2009 et 2012). Ce linker et ce CBD ont pour rôle de favoriser l'accessibilité et la fixation au substrat (Howard *et al.*, 2004 ; Boraston *et al.*, 2004). Selon Pieretti *et al.* (2012), ces enzymes seraient particulièrement adaptées au mode de vie xylémique de *X. albilineans* et à la dégradation des parois et des substrats carbonés présents dans la sève brute. Les PCWDE codées par les autres espèces de *Xanthomonas* ne possèdent pas ce CBD associé à un long linker (Figure 39). Il est cependant intéressant de noter que *Xylella fastidiosa* code deux PCWDE possédant aussi un long linker et un CBD. Le rôle de ces enzymes particulières codées par *X. albilineans* reste à déterminer.

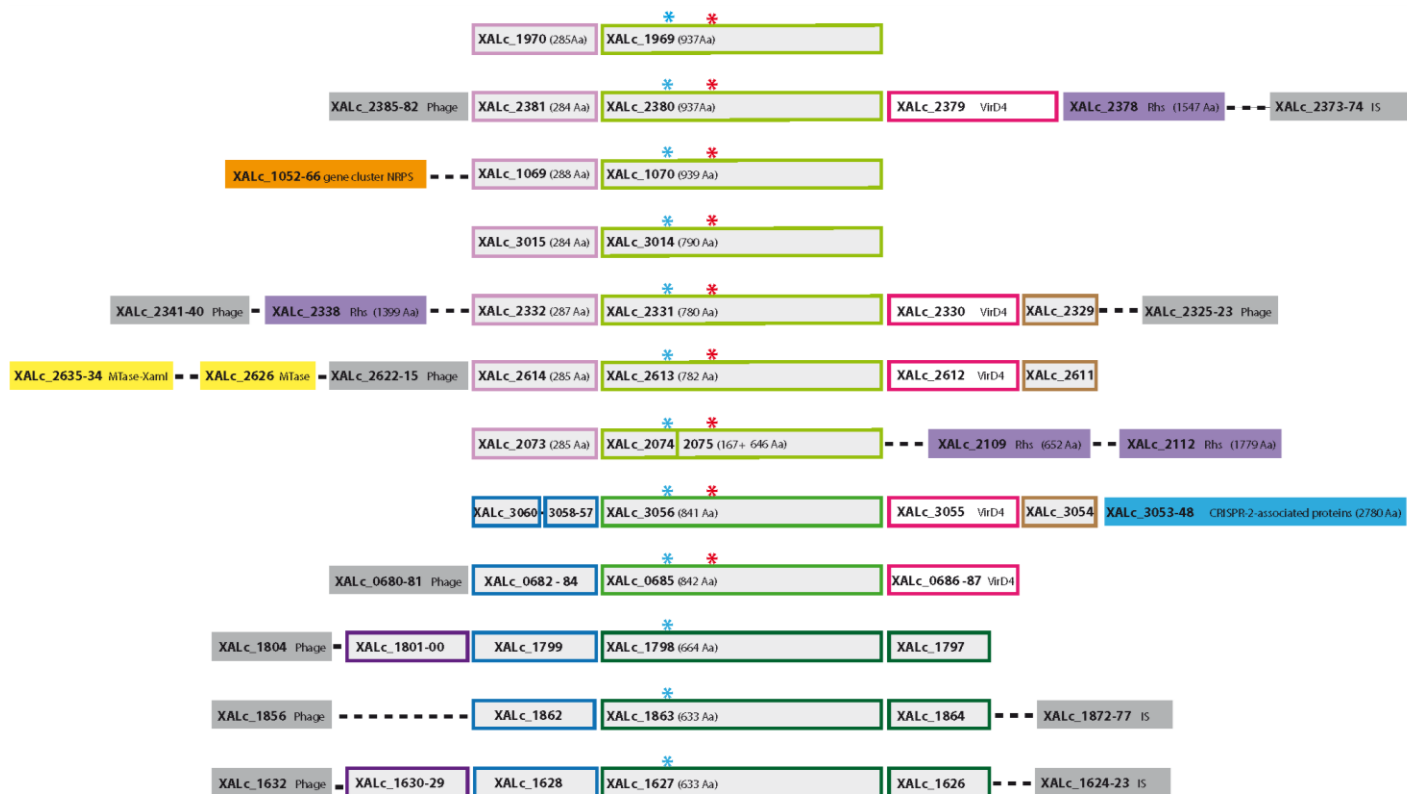


Figure 40. Représentation des 12 copies du cluster de gènes de 5 kb présent dans 12 loci du génome de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* (Pieretti *et al.*, 2012). XALc_1969, XALc_2380, XALc_1070, XALc_3014, XALc_2331 et XALc_2613 présentent 59 à 88% d'identité en acides aminés (Aa) avec XALc_2074 et XALc_2075 ; XALc_3056 présente 93% d'identité en acides aminés avec XALc_0685 ; XALc_1798 et XALc_1863 présentent 84% d'identité en acides aminés avec XALc_1627. Les trois groupes partagent au moins 45% d'identité en acides aminés. Les étoiles bleues et rouges correspondent respectivement à la triade Ser-His-Asp et au linker polyserine.

3.3.2.3.4 Un cluster de 5 kb présent dans douze loci différents

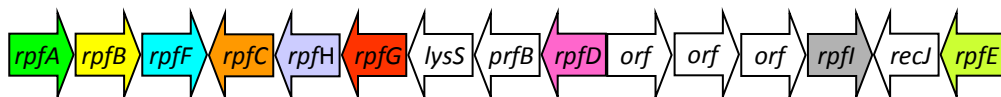
D'une manière intrigante, il existe dans le génome de *X. albilineans* un même groupement de gènes de 5 kb présent dans 12 loci différents (Figure 40) (Pieretti *et al.*, 2012). Certains gènes sont partagés par plusieurs de ces loci et présentent une identité élevée en acides aminés, ce qui suggère qu'ils sont impliqués dans des processus moléculaires similaires. En tenant compte du pourcentage d'identité des gènes entre eux, les 12 copies de ce cluster peuvent être divisées en trois groupes. Ces trois groupes partagent moins de 45% d'identité en acides aminés et ils pourraient donc être impliqués dans trois processus moléculaires distincts (Pieretti *et al.*, 2012). Les protéines codées par ce groupement de gènes de 5 kb sont des protéines hypothétiques qui ne contiennent aucun domaine fonctionnel conservé et ne correspondent que partiellement à des protéines hypothétiques codées par *X. campestris* pv. *musacearum*, *X. campestris* pv. *vasculorum* ou *X. oryzae* pv. *oryzae*. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les 12 copies de ce cluster codent chacune une protéine contenant une triade Serine-Histidine-Asparagine (SHD) caractéristique des enzymes hydrolytiques de la famille des α/β -hydrolases. De plus, neuf de ces protéines contenant la triade SHD contiennent également un polyserine-linker (PSL) qui sépare deux domaines putatifs dont la fonction est inconnue. Ce PSL est décrit comme étant une région flexible qui favorise l'accessibilité au substrat, ce qui augmenterait par conséquent l'activité enzymatique des protéines (Howard *et al.*, 2004). La présence de ce PSL et de la triade SHD suggère que ces 12 copies de ce groupement de gènes de 5 kb seraient impliquées dans l'utilisation de substrats spécifiques de la canne à sucre (Pieretti *et al.*, 2012).

3.4 Facteurs de pathogénie chez *X. albilineans*

3.4.1 Facteurs de pathogénie identifiés par génomique fonctionnelle

Afin d'identifier de nouveaux gènes candidats potentiellement impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans*, une mutagenèse aléatoire du génome de *X. albilineans* a été réalisée à l'université de Floride (Rott *et al.*, 2011). Soixante-et-un mutants affectés dans leur capacité à produire des symptômes ou à se multiplier dans la tige de canne à sucre ont été identifiés (Rott *et al.*, 2011). La zone d'insertion du transposon dans le génome de ces mutants a été séquencée et, grâce à la séquence de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* (Pieretti *et al.*, 2009), les gènes inactivés ont pu être identifiés. Ces gènes codent potentiellement des protéines impliquées dans diverses fonctions comme la biosynthèse de

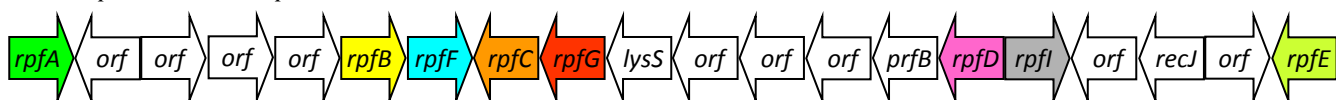
Xanthomonas campestris pv. *campestris* strain ATCC 33913



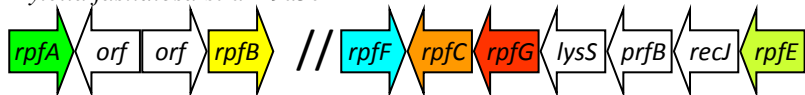
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* strain 85-10



Stenotrophomonas maltophilia strain K279a



Xylella fastidiosa strain 9a5c



Xanthomonas albilineans strain PC73

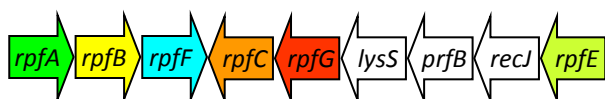


Figure 41. Organisation des gènes *rpf* chez *X. albilineans* et chez d'autres *Xanthomonadaceae* (Rott, non publié). Comme *Xylella fastidiosa*, *X. albilineans* ne possède que 6 gènes *rpf*.

polysaccharides de surface (6 loci), la biosynthèse d'acides gras (2 loci), des systèmes de sécrétion (1 locus), la régulation et la signalisation cellulaire (2 loci), et le transport (5 loci) (Rott *et al.*, 2011). De plus, neuf gènes sont prédits comme codant des protéines de fonction inconnue, et notamment une protéine OmpA de la membrane externe. En outre, l'implication des gènes *rpf* dans la pathogénie de *X. albilineans* a été récemment étudiée (Rott *et al.*, 2013). Le rôle de ces gènes candidats de pathogénie est présenté ci-dessous.

3.4.1.1 Les gènes du quorum-sensing

Un cluster de gènes appelé *rpf* (pour « regulation of pathogenicity factors ») a été décrit dans le génome de *X. albilineans* (Pieretti *et al.*, 2009). Ces gènes *rpf* codent le QS, un système de signalisation qui dépend de la production d'une molécule signal diffusible appelé DSF (cf. partie 1 paragraphe 2.3.7) (Deng *et al.*, 2011 ; Ryan et Dow, 2011). Le cluster de gènes *rpf*, caractérisé pour la première fois chez *X. campestris* pv. *campestris* (Tang *et al.*, 1991), comprend, chez la plupart des *Xanthomonas*, neuf gènes annotés de *rpfA* à *rpfI*. Le génome de *X. albilineans* contient six gènes *rpf* uniquement (*rpfA*, *rpfB*, *rpfF*, *rpfC*, *rpfG* et *rpfE*) dont l'organisation est similaire à celle des autres *Xanthomonas* (Figure 41). Par ailleurs, les gènes *rpfF*, *rpfC* et *rpfG* de *X. albilineans* partagent une identité élevée en acides aminés avec ceux des autres *Xanthomonas* (Rott *et al.*, 2013). Cependant, bien que RpfF, RpfC et RpfG soient conservés chez les *Xanthomonadaceae*, ces derniers ont des rôles différents d'une espèce bactérienne à l'autre. Cette diversité des rôles montre que les bactéries adaptent ce système de régulation en fonction de leurs besoins afin de coloniser des niches écologiques diverses (Chatterjee *et al.*, 2008a et b; Dow, 2008 ; Gudesblat *et al.*, 2009 ; Rott *et al.*, 2013).

Le DSF est produit par *X. albilineans* (Rott *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2004), mais son rôle reste énigmatique à ce jour. En effet, la mutation du gène *rpfF* chez la souche XaFL07-1 de *X. albilineans* ne semble pas avoir un effet sur sa capacité à se multiplier dans la tige de la canne à sucre et à provoquer les symptômes de la maladie (Rott *et al.*, 2009 ; Rott *et al.*, 2013). En revanche, la colonisation de la tige de la canne par *X. albilineans* est négativement régulée par le système de régulation RpfC/RpfG. En effet, l'inactivation partielle ou totale du récepteur de DSF chez la même souche de *X. albilineans* (gènes *rpfC* et *rpfG*) permet à la bactérie de coloniser le bas de la tige de façon plus efficace que la souche sauvage (Rott *et al.*, 2013). De plus, une surproduction du DSF a été observée lors de l'inactivation totale ou

partielle de ces gènes. Toutefois, la surproduction du DSF n'explique pas la capacité élevée de ces souches à coloniser la tige de la canne. En effet, la souche mutée au niveau des gènes *rpfF*, *rpfG* et *rpfC* (triple mutation) ne produit pas de DSF et conserve néanmoins une capacité de colonisation élevée. Le système de régulation RpfC/RpfG pourrait donc être aussi sous la dépendance d'une molécule signal autre que le DSF.

Contrairement à ce qui a été décrit pour d'autres bactéries phytopathogènes, **les gènes *rpf* de *X. albilineans* n'apparaissent pas essentiels pour la multiplication de cette espèce bactérienne dans la plante et la production de symptômes**. Le rôle de ces gènes dans la pathogénie de cette bactérie reste à préciser, d'autant plus que des mutants du récepteur de DSF ont une mobilité réduite *in vitro*, alors qu'*in planta* ils ont une capacité élevée à coloniser la tige de la canne (Rott *et al.*, 2013). Le DSF pourrait par exemple avoir un rôle dans la vie épiphyte de *X. albilineans* ou dans la formation de biofilms, voire un rôle dans la capacité de la bactérie à contourner la fermeture des stomates (mécanisme de défense mis en place par la plante pour limiter la pénétration des bactéries), comme c'est le cas pour *X. campestris* pv. *campestris* (Gudesblat *et al.*, 2009).

Les bactéries du genre *Xanthomonas* produisent également une autre molécule appelée DF (pour « **D**iffusible **F**actor »). La biosynthèse de cette molécule est codée par le gène *xanB2*. Chez *X. campestris* pv. *campestris*, ce facteur diffusible régule la production des xanthomonadines (pigments de couleur jaune) et des exopolysaccharides (EPS), des produits indispensables pour la vie épiphyte et la pathogénie de cette bactérie (Poplawsky et Chun, 1998). Les mutants *xanB2* de la souche XaFL07-1 ne sont pas affectés dans leur capacité à coloniser la tige de la canne à sucre et à provoquer les symptômes de la maladie (Rott *et al.*, 2009). **Ces travaux montrent donc que le facteur diffusible DF n'est pas non plus indispensable pour la production des symptômes de la maladie et pour la colonisation de la tige par *X. albilineans***. Par ailleurs, tous les essais mis en place pour démontrer la production du facteur diffusible DF par *X. albilineans* se sont à ce jour avérés infructueux (Rott, communication orale).

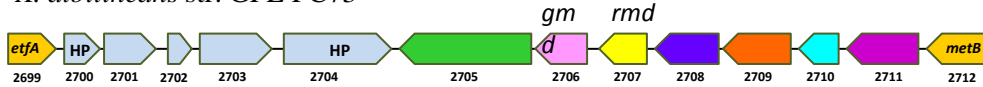
3.4.1.2 Les polysaccharides de surface

Les polysaccharides synthétisés par les bactéries existent majoritairement sous deux formes : les lipopolysaccharides (LPS) qui sont ancrés dans la paroi bactérienne, et les exopolysaccharides (EPS) qui sont relargués dans le milieu extracellulaire ou restent associés

X. campestris pv. *campestris* str. B100



X. albilineans str. GPE PC73



X. campestris pv. *vasculorum* str. NCPPB702



Figure 42. Comparaison du cluster des gènes LPS chez *X. albilineans* (souche GPE PC73), *X. campestris* pv. *campestris* (souche B100) et *X. campestris* pv. *vasculorum* (souche NCPPB702) (Pieretti *et al.*, 2012). Les gènes orthologues sont représentés par la même couleur. Les gènes spécifiques à chaque espèce sont présentés en gris chez *X. campestris* pv. *campestris*, en bleu chez *X. albilineans* et en beige chez *X. campestris* pv. *vasculorum*. HP: protéine hypotéthyque, IS: séquence d'insertion.

à la cellule sous forme de capsule. Les polysaccharides de surface sont des facteurs de virulence majeurs des bactéries phytopathogènes, notamment les *Xanthomonas*, et jouent des rôles divers et variés dans l'interaction entre les bactéries et leur plante hôte (Büttner et Bonas, 2009 ; Newman *et al.*, 2001).

Chez les bactéries du genre *Xanthomonas*, les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des LPS sont variables en nombre et en identité (Lu *et al.*, 2008). Par ailleurs, tous ces clusters sont bordés de part et d'autre par deux gènes qui sont conservés chez tous les *Xanthomonas*, à savoir *etfA* ("electron transport flavoprotein") et *metB* ("cystathionine gamma lyase"). Dans le génome de *X. albilineans*, le cluster de gènes LPS est également bordé par les gènes *etfA* et *metB* et comprend 12 gènes (XALc_2700 à XALc_2711) (Figure 42). Cinq de ces gènes (XALc_2700 à XALc_2704) sont spécifiques de *X. albilineans*, alors que les sept autres (XALc_2705, *gmd*, *rmd*, XALc_2708, XALc_2709, *xzm*, et XALc_2711) présentent une identité élevée en acides aminés avec ceux de *X. campestris* pv. *vasculorum* (agent causal de la gommose de la canne à sucre) (Figure 42) (Pieretti *et al.*, 2012). Pieretti *et al.* (2012) ont suggéré que les gènes conservés chez ces deux agents pathogènes sont impliqués dans la biosynthèse de LPS qui seraient spécifiquement adaptés pour interagir avec la canne à sucre.

Par ailleurs, les *Xanthomonas* produisent un EPS caractéristique appelé xanthane. Plusieurs loci sont impliqués dans la production de la gomme xanthane, dont un cluster de gènes *gum* (*gumB* à *gumM*) qui est conservé chez les *Xanthomonas* (Katzen *et al.*, 1998; Vojnov *et al.*, 1998). *X. albilineans* est l'unique espèce du genre *Xanthomonas* à ne pas posséder les gènes *gum* (Pieretti *et al.*, 2009). Cependant, *X. albilineans* possède les gènes *xanA* et *xanB* responsables de la biosynthèse de sucre précurseurs du xanthane. *X. albilineans* possède également d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse du xanthane, comme les gènes *pgi*, *galU* et *ugd* qui permettent respectivement la biosynthèse des sucres nucléotidiques UDP-D-glucose, GDP-D-mannose et l'acide UDP-D-glucuronique (Pieretti *et al.*, 2009 et 2012).

Bien que *X. albilineans* ne dispose pas de gènes *gum*, cette bactérie produit des polysaccharides au niveau de sa surface cellulaire. Une dizaine de mutants ne produisant plus de polysaccharides de surface (PS) ont été identifiés grâce à une mutagenèse aléatoire réalisée avec la souche XaFL07-1 originaire de Floride (Rott *et al.*, 2011). Contrairement à la souche sauvage de *X. albilineans* qui a un aspect visqueux sur milieu gélosé, les cultures bactériennes mutées au niveau des gènes de PS sont sèches au grattage, confirmant que ces mutants ne

produisent plus de PS. Chez *X. albilineans*, la mutation de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de PS provoque une réduction importante de la capacité de l'agent pathogène à se multiplier dans la tige et une forte atténuation voire l'absence des symptômes de la maladie.

Néanmoins, la production *in planta* d'une molécule xanthane-like par *X. albilineans* a récemment été signalée (Blanch *et al.*, 2008a ; Fontaniella *et al.*, 2002). D'après ces travaux, il s'agit d'un tétrasaccharide composé de deux molécules de glucose, d'une molécule de mannose et d'acide glucuronique (Blanch *et al.*, 2008b). Seules les cannes infectées par *X. albilineans* seraient capables de relarguer de l'acide glucuronique et de produire ce polysaccharide proche du xanthane (Legaz *et al.*, 2011). Ces résultats sont tout de même surprenants étant donnée l'absence des gènes *gum* chez *X. albilineans*.

3.4.1.3 Les protéines de la membrane externe

Les protéines membranaires de la famille OmpA (pour « **O**uter **M**embrane **P**roteins ») constituent une composante majeure de la membrane externe des entérobactéries (Koebnik *et al.*, 2000 ; Krishnan *et al.*, 2012). A titre d'exemple, cette protéine est exprimée chez *E. coli* à environ 100 000 copies par cellule (Koebnik *et al.*, 2000). Etant donné les rôles divers qu'elle peut jouer, la protéine OmpA est considérée comme une protéine multi-facette (Krishnan *et al.*, 2012 ; Smith *et al.*, 2007). En effet, chez les bactéries pathogènes de l'homme, cette protéine est cruciale pour la virulence car elle est requise pour l'adhésion aux tissus de l'hôte, l'invasion, et l'évasion du système immunitaire de l'hôte (Krishnan et Prasadarao, 2012 ; Ristow *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007 ; Wang et Kim, 2002). Peu de données existent dans la littérature au sujet du rôle de ces protéines chez les bactéries phytopathogènes. Une protéine membranaire OmpA (appelée également MopB) constitue une protéine membranaire majeure chez *X. campestris* pv. *campestris* (Chen *et al.*, 2010). L'inactivation du gène codant cette protéine a un effet pléiotropique car elle induit une déformation de la structure membranaire de la bactérie, une agrégation anormale des cellules, et elle affecte aussi l'adhésion, la mobilité et la pathogénie de *X. campestris* pv. *campestris* sur le chou (Chen *et al.*, 2010).

La mutagenèse aléatoire du génome de la souche de *X. albilineans* XaFL07-1 a conduit à l'identification de cinq mutants du gène XALc_0557 (orthologue *dwf*³*pg*^o *opB* de "*X. campestris*") (Rott *et al.*, 2011). Le gène XALc_0557 est prédit coder pour deux domaines distincts: un domaine N-terminal appelé OMC (pour « **O**uter **M**embrane **C**hannels ») de la super-famille des porines, et un domaine C-terminal-like. L'inactivation de cette protéine

(appelée XaOmpA1) chez la souche XaFL07-1 de *X. albilineans* rend la bactérie quasi incapable de se multiplier dans la tige de la canne à sucre et de provoquer des symptômes. La bactérie est également affectée dans sa mobilité *in vitro* et dans sa capacité à croître en milieu riche et en milieu pauvre, ce qui pourrait expliquer les difficultés de la bactérie à coloniser sa plante hôte (Rott *et al.*, 2011). Des observations en microscopie électronique ont aussi permis de montrer que les mutants XaOmpA1 ont une structure membranaire altérée et sont caractérisés par une hyperproduction de vésicules membranaires (Fleites *et al.*, 2013). La partie OMC N-terminale et la partie C-terminale de la protéine XaOmpA sont toutes les deux nécessaires pour l'expression de la pathogénie de *X. albilineans*. La protéine XaOmpA1 **semble donc plutôt jouer essentiellement un rôle dans la fitness de la bactérie que dans la pathogénie *sensu stricto***. On ne peut cependant pas exclure l'hypothèse que cette protéine ait un rôle « offensif » dans la pathogénie de la bactérie, en altérant par exemple l'export de la toxine albicidine (Fleites *et al.*, 2013). En effet, on peut logiquement penser que l'export de l'albicidine à partir du cytoplasme de la cellule bactérienne, qui dépend d'une pompe à efflux dans la membrane externe (Pieretti *et al.*, 2009), est certainement lié à l'intégrité de cette membrane. Un tel effet n'a cependant pas été observé *in vitro* (Fleites *et al.*, 2013). Par ailleurs, les vésicules membranaires externes OMV (pour « **O**uter **M**embrane **V**esicles) sont aussi reconnues comme pouvant transporter des facteurs de virulence (Sidhu *et al.*, 2008). Une hyper-production d'OMV pourrait donc aussi affecter le rôle « offensif » de la protéine XaOmpA1 dans la pathogénie de *X. albilineans*.

3.4.2 Facteurs putatifs de pathogénie identifiés par hybridation soustractive et suppressive

Afin d'identifier des gènes putatifs de pathogénie, une analyse comparative par hybridation soustractive et suppressive a été réalisée pour comparer une souche très pathogène (XaFL07-1 originaire de Floride) et une souche moins pathogène (Xa23R1 originaire de Floride). La séquence des clones obtenus a ensuite été blastée avec la séquences des génomes de deux autres souches très pathogènes (GPE PC73 originaire de Guadeloupe et HVO82 originaire du Burkina Faso). Les souches XaFL07-1 et GPE PC73 sont associées à la recrudescence de l'échaudure des feuilles en Floride et en Guadeloupe et à la transmission de la maladie par voie aérienne. Cette étude a permis de mettre en évidence 20 ORFs et une large région intergénique présents uniquement chez les trois souches très pathogènes de *X. albilineans*. Les ORFs caractéristiques des souches pathogènes codent des ABC transporteurs,

une oxidoréductase et plusieurs protéines hypothétiques dont l'importance dans la pathogénie reste à préciser (Pieretti *et al.*, 2012).

3.5 Variabilité du pouvoir pathogène et diversité génétique de *X. albilineans*

La culture de variétés résistantes est le moyen de lutte le plus efficace contre l'échaudure des feuilles. Cependant, malgré le développement de variétés de canne à sucre améliorées et sélectionnées pour leur résistance à *X. albilineans*, plusieurs cas d'échaudure des feuilles ont été signalés sur des variétés considérées comme résistantes jusqu'alors. Ces chutes de résistance des variétés de canne à sucre améliorées ont souvent été attribuées à l'apparition de nouvelles souches de *X. albilineans*, et donc à une variation de pathogénie de cet agent pathogène, mais cela n'a jamais pu être démontré sans équivoque. Ce n'est qu'en 1986 que trois sérotypes et six lysogroupes de *X. albilineans* ont été décrits (Rott *et al.*, 1986 et 1994), mais aucune relation entre ces variants de la bactérie et la variabilité du pouvoir pathogène n'a pu être mise en évidence.

Suite à la recrudescence de la maladie dans les années 1980-1990 dans le bassin caribéen, et notamment aux Antilles et en Floride, une étude approfondie de la diversité génétique de *X. albilineans* a été réalisée par la technique d'électrophorèse en champ pulsé ou PFGE (pour « **P**ulsed **F**ield **G**el **E**lectrophoresis »). La caractérisation de plus de 200 souches de *X. albilineans* originaires d'une trentaine de pays cultivant la canne à sucre a ainsi permis de mettre en évidence l'existence de 54 haplotypes et d'au moins 10 groupes génétiques différents au sein de cette espèce bactérienne (Clerc, 1997 ; Davis *et al.*, 1997). Un de ces groupes (appelé PFGE-B) a notamment été associé à la recrudescence de la maladie dans le bassin caribéen, ainsi qu'à la dissémination de *X. albilineans* par voie aérienne (Champoiseau *et al.*, 2006b ; Davis *et al.*, 1997).

En se basant sur ces résultats, l'hypothèse de l'existence de deux types de souches de *X. albilineans* a été émise. Le premier type correspondrait aux souches du groupe génétique PFGE-B et ces souches seraient transmises par voie aérienne. Le deuxième type rassemblant les souches du groupe génétique PFGE-A ne serait pas transmis par voie aérienne (Davis *et al.*, 1997).

Une diversité génétique de *X. albilineans* a aussi été décrite récemment au sein d'une collection mondiale de souches en utilisant une sonde d'ADN comprenant des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine (Champoiseau *et al.*, 2006a). Cette étude a

permis de mettre en évidence un profil RFLP spécifique des souches du groupe PFGE-B qui est lié à la méthylation de l'ADN génomique au niveau des sites de restriction *Sall* (Royer, communication personnelle).

Des variations de production de l'albicidine ont également été observées parmi les souches de *X. albilineans* (Renier *et al.*, 2007). Cependant, aucune relation entre la variation de production d'albicidine, la diversité génétique et la variation de pathogénie n'a pu être mise en évidence à ce jour chez *X. albilineans* (Champoiseau *et al.*, 2006a ; Renier *et al.*, 2007). **L'albicidine, si elle apparaît impliquée dans la pathogénie de *X. albilineans*, ne permet pas à ce jour d'expliquer les variations de pathogénie chez *X. albilineans*.** D'autres facteurs, qui sont encore non identifiés, jouent donc clairement un rôle important dans l'expression et la variation de la pathogénie, notamment dans la capacité de l'agent pathogène à être transmis par voie aérienne, à coloniser la phyllosphère et le système vasculaire de la canne à sucre.

Objectifs de la thèse

Chapitre II : Objectifs de la thèse

Une meilleure connaissance des étapes clés du cycle infectieux d'un agent pathogène sur son hôte, ainsi que l'identification des déterminants moléculaires impliqués dans ces étapes, sont indispensables pour comprendre les mécanismes d'interaction entre une plante et un agent pathogène.

Les mécanismes qui régissent l'interaction entre *Xanthomonas albilineans* et la canne à sucre sont très peu étudiés. Cette situation est attribuable aux deux protagonistes car, d'une part la canne à sucre est une plante des régions chaudes d'assez grande taille et à génome complexe, et d'autre part, *X. albilineans* n'est pas facilement manipulable au laboratoire (croissance relativement lente sur milieu gélosé) et elle est associée à une phase de latence qui peut compliquer les expérimentations sur plante. De plus, cette espèce bactérienne est un membre particulier du genre *Xanthomonas* et bénéficie peu des recherches effectuées sur les membres classiques de la famille des *Xanthomonadaceae* que sont *X. campestris*, *X. vesicatoria* ou *X. oryzae* par exemple. En effet, comme nous venons de le voir dans la partie bibliographique, *X. albilineans* est une bactérie qui, tout en présentant des similarités, se différencie nettement des autres *Xanthomonas*. Elle a été décrite comme une bactérie possédant une artillerie minimale car elle est dépourvue de plusieurs gènes qui sont essentiels à la pathogénie chez la majorité des autres bactéries phytopathogènes. Le système de sécrétion de type III Hrp et les gènes *gum* constituent ainsi deux mécanismes de pathogénie les plus significatifs qui font défaut à l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre (Pieretti *et al.*, 2012).

Au début de ce travail de thèse, les seuls facteurs de virulence qui avaient été identifiés et confirmés étaient l'albicidine et au-moins une autre petite molécule synthétisée par les gènes NRPS (Birch, 2001 ; Marguerettaz, 2010). Toutefois, ces facteurs ne permettent d'expliquer que très partiellement la pathogénie de cette bactérie car des mutants de *X. albilineans* dans les gènes impliqués dans la biosynthèse de ces molécules sont toujours capables de provoquer des symptômes ou de se multiplier dans la canne à sucre. Par ailleurs, toutes les recherches de gènes de pathogénie ont été focalisées jusqu'à présent sur la capacité de la bactérie à se multiplier dans la tige (en terme quantitatif), alors que les étapes qui précèdent l'envahissement de la tige n'ont pas encore été explorées. Ces étapes précoces de l'infection sont cependant cruciales car certaines souches de *X. albilineans* sont transmises par voie aérienne et colonisent la surface des feuilles avant de pénétrer dans les tissus de la plante

(Daugrois *et al.*, 2003 et 2012). De même, peu de données existent dans la littérature au sujet de la localisation précise de la bactérie dans les tissus de la canne à sucre. En se basant sur des données de microscopie (Birch, 2001) et étant donné qu'elle a un génome réduit (Pieretti *et al.*, 2009), *X. albilineans* a été considérée à ce jour comme une bactérie limitée au xylème de la plante hôte. Cependant, des études publiées très récemment suggèrent la présence de la bactérie hors du xylème, mais ce résultat n'a pas été clairement prouvé (Legaz *et al.*, 2011).

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse étaient (i) d'étudier la capacité de *X. albilineans* à survivre en surface des feuilles de la canne à sucre, (ii) de préciser la localisation de la bactérie dans les tissus foliaires et caulinaire de la canne à sucre et (iii) d'identifier des déterminants moléculaires impliqués dans ces étapes de colonisation de la plante hôte. Pour cela, une approche avec *a priori* a été entreprise. En effet, l'existence de plusieurs gènes candidats de pathogénie chez *X. albilineans* (Rott *et al.* 2011), et notamment ceux décrits ci-dessous, nous a conduit à émettre l'hypothèse que certains d'entre eux pourraient jouer un rôle important dans les étapes de colonisation de la canne à sucre. Dans ce but, les souches suivantes de *X. albilineans* ont été caractérisées (Tableaux 11 et 12):

- Quatorze souches de *X. albilineans* mutées dans des gènes impliqués dans la production de polysaccharides de surface, d'une protéine membranaire (XaOmpA), de métabolites secondaires (molécules produites par des NRPS), du facteur diffusible DSF, du système de sécrétion SST3 SPI-1 (Rott *et al.*, 2011 et résultats non publiés) (Tableau 11).
- Deux souches sauvages de *X. albilineans* appartenant au groupe PFGE-B et donc potentiellement transmises par voie aérienne (XaFL07-1 et GPE PC73, souches pathogènes) (Tableau 12) (Davis *et al.*, 1997).
- La souche XaS3, proche de *X. albilineans* (souche non pathogène qui est capable de coloniser la canopée de la canne à sucre en absence de souches pathogènes de *X. albilineans*) (Tableau 12) (Daugrois *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus sont présentés dans deux chapitres : le premier chapitre est consacré aux déterminants moléculaires impliqués dans la survie épiphyte de *X. albilineans*, tandis que le deuxième chapitre comprend les travaux réalisés sur la localisation de *X. albilineans* dans les tissus de la canne.

Tableau 11. Mutants de *X. albilineans* utilisés au cours de notre étude.

Fonction	Mutant	Molécule produite	Locus	Gène	Gène Orthologue*	Pathogénie**		Type de mutation	Référence
						Sévérité des symptômes	Colonisation de la tige		
Production de polysaccharides de surface (PS)	M 427	Mannose phosphate isomérase de l'opéron <i>xan</i>	XALc_2693	<i>xanB</i>	XOO0796	-	-	Transposon	1
	M 903	Glycosyl transférase de l'opéron <i>gmd-rmd</i>	XALc_2705		XCC3630	+	+		
	M 967	NDP-hexose oxidoréductase de l'opéron <i>gmd-rmd</i>	XALc_2706	<i>gmd</i>	XCC3627	++	+++		
	M 1116	NDP-hexose oxidoréductase de l'opéron <i>gmd-rmd</i>	XALc_2707	<i>rmd</i>	XCV3717	-	-		
	M 448	Glycosyltransférase de l'opéron <i>galU</i>	XALc_1598		XCV2492	Similaire à la souche sauvage	Similaire à la souche sauvage		
	M 514	ABC transporteur ATP-protéine d'adhésion	XALc_2709		XOO0789	?	?		
Protéine de la membrane externe	M468	Protéine XaOmpA1	XALc_0557		XCV1042	-	-		
Production d'albicidine + une ou plusieurs petites molécules	Alb XXI M8	Phosphopantéthéinyl transférase	XALc_1736	<i>albXXI</i>	XOO3083	Similaire à la souche sauvage	Similaire à la souche sauvage (sauf au sommet de la tige)	Délétion	1
Système de sécrétion de Type III	SST3 SPI-1 <i>xsaO</i>	Système de sécrétion	XALc_1491	<i>xsaO</i>	-	Similaire à la souche sauvage	Similaire à la souche sauvage	Insertion	2
	SST3 SPI-1 <i>xsaM</i>	Système de sécrétion	XALc_1489	<i>xsaM</i>	-	Similaire à la souche sauvage	Similaire à la souche sauvage		
Communication entre cellules bactériennes (Quorum sensing)	<i>rpjF</i> M7	Enoyl-CoA hydratase : DSF synthase	XALc_1347	<i>rpjF</i>	XCV1920	Similaire à la souche sauvage	Similaire à la souche sauvage	Insertion	3

<i>rpjG</i> M6	Composante du récepteur de DSF	XALc_1345	<i>rpjG</i>	XCV1917	Similaire à la souche sauvage	Plus pathogène que la souche sauvage	Délétion	3
<i>rpjC</i> M29	Composante du récepteur de DSF	XALc_1346	<i>rpjC</i>	XCV1919	Similaire à la souche sauvage	Plus pathogène que la souche sauvage		
<i>rpjGCF</i> M15	DSF synthase, composantes du récepteur de DSF	XALc_1345 XALc_1346 XALc_1347	<i>rpjG</i> <i>rpjC</i> <i>rpjF</i>	XCV1917 XCV1919 XCV1920	Un peu moins pathogène que la souche sauvage	Plus pathogène que la souche sauvage		

1 : Rott *et al.*, 2011 ; **2** : Marguerettaz, 2010 ; **3** : Rott *et al.*, 2013

* : Xcc = *X. campestris* pv. *campestris* 8004 (Qian *et al.*, 2005), Xoo = *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 (Wang *et al.*, 2008), Xcv = *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 (Thieme *et al.*, 2005).

** : La pathogénie des souches mutantes a été évaluée en comparant respectivement la sévérité des symptômes et la colonisation de la tige à celles observées pour la souche sauvage (XaFL07-1). - = 0-10%, + = 11 à 30%, ++ = 31-50%, +++ = 51-70%, ++++ = 71-95%.

Tableau 12. Souches sauvages de *X. albilineans* utilisées au cours de notre étude.

Souche	Origine	Caractéristiques	Référence bibliographique
GPE PC 73	Guadeloupe	Souche pathogène du groupe PFGE-B potentiellement transmise par voie aérienne	1
XaFL07-1	Floride (USA)	Souche pathogène du groupe PFGE-B potentiellement transmise par voie aérienne	2
XaS3 (= GPE39)	Guadeloupe	Espèce bactérienne proche de <i>X. albilineans</i> , isolée à partir de la canopée de la canne à sucre, mais non pathogène (n'est pas capable de se multiplier dans la tige de canne à sucre ni de provoquer des symptômes après inoculation)	3

1 : Davis *et al.*, 1997 ; **2** : Rott *et al.*, 2011 ; **3** : Daugrois *et al.*, 2003

Résultats

Partie 1 : Déterminants moléculaires impliqués dans la survie épiphyte de *Xanthomonas albilineans*

Chapitre III : Résultats

Partie 1 : DÉTERMINANTS MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA SURVIE ÉPIPHYTE DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS*

Avant de coloniser leur plante hôte, certaines bactéries phytopathogènes foliaires, comme la plupart des *Pseudomonas* mais aussi plusieurs *Xanthomonas*, se développent en tant qu'épiphyte en surface des feuilles. Cette étape précoce du cycle infectieux est déterminante pour l'initiation et la réussite de l'infection, et elle permet également la dispersion et la dissémination de ces agents pathogènes (Akhavan *et al.*, 2013 ; Hirano et Upper, 2000). La phyllosphère est cependant un environnement hostile où les conditions environnementales varient constamment, et les bactéries épiphytes y sont sujettes à différents stress biotiques et abiotiques. Avec pour objectif de survivre et de se multiplier dans cet environnement, les bactéries phytopathogènes déploient de nombreuses stratégies. Elles doivent d'abord percevoir les stimuli environnementaux par chimio-tactisme, puis se déplacer vers les niches riches en nutriments. Elles adhèrent ensuite à ces surfaces où elles constituent très souvent des biofilms, un type de structure qui leur permet de mieux résister aux stress environnementaux. Les bactéries épiphytes se dispersent ensuite du biofilm pour pénétrer à travers les stomates, les hydathodes ou des blessures, dans les tissus de la plante hôte et initier ainsi la maladie.

Plusieurs gènes, comme les gènes *rpf*, les exopolysaccharides (EPS) et les lipopolysaccharides (LPS), sont nécessaires pour l'installation et le développement des bactéries du genre *Xanthomonas* au niveau de la phyllosphère (Hugouvieux *et al.*, 1998 ; Gudesblat *et al.*, 2009 ; Li et Wang, 2011b ; Rigano *et al.*, 2007). Les EPS sont des constituants majeurs du biofilm et sont indispensables, non seulement pour la formation du biofilm, mais également pour la survie épiphyte des bactéries. Ainsi, une mutation du gène *gumB* (nécessaire pour la production d'EPS) rend la bactérie *X. axonopodis* pv. *citri* incapable de former des biofilms et de survivre en surface des feuilles d'agrumes (Rigano *et al.*, 2007). Des phénotypes identiques sont obtenus suite à la mutation de gènes impliqués dans la biosynthèse des LPS chez cette même espèce bactérienne (Li et Wang, 2011b).

Les gènes *rpf* jouent un rôle de régulation dans la formation et la dispersion des biofilms, ainsi que dans la synthèse de facteurs de virulence (EPS notamment). Cependant, ils sont aussi directement impliqués dans la survie épiphyte des *Xanthomonas*.

Chez *X. campestris* pv. *campestris*, par exemple, la signalisation *rpf*-dépendante est nécessaire pour la production d'une petite molécule qui est à son tour indispensable pour le contournement de la fermeture des stomates, une réaction de défense de la plante contre l'invasion des agents pathogènes (Gudesblat *et al.*, 2009).

Xanthomonas albilineans est essentiellement propagée par les boutures de canne à sucre infectées utilisées au moment de la plantation, mais aussi par les outils de coupe contaminés. Cependant, il existe des souches de cette espèce bactérienne qui sont transmises par voie aérienne et qui sont capables de coloniser la phyllosphère avant de pénétrer dans la plante hôte. Ces souches ont notamment été associées à la recrudescence de l'échaudure des feuilles dans les années 1980-1990 dans le bassin caribéen (Daugrois *et al.*, 2003 et 2012). Les déterminants moléculaires impliqués dans la survie épiphyte de *X. albilineans* sont encore inconnus. L'objectif de mes travaux était donc d'identifier des déterminants moléculaires impliqués dans cette phase du cycle infectieux de *X. albilineans*. Trois souches sauvages de *X. albilineans* (Tableau 12), ainsi que douze mutants candidats de pathogénie (Tableau 11) ont été testés pour leur capacité de survie épiphyte sur de jeunes plants de canne à sucre cultivés *in vitro*. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont été valorisés sous forme de trois articles :

Article I : **Mensi I**, Pieretti I, Gargani D, Fleites LA, Noell J, Bonnot F, Gabriel DW, Rott P, « Surface polysaccharides and quorum-sensing are involved in survival of *Xanthomonas albilineans* on sugarcane leaves » qui sera soumis prochainement pour publication dans la revue '*Plant Molecular Pathology*'.

Article II : (cf. annexe 1): Fleites L, **Mensi I**, Gargani D, Zhang S, Rott P, Gabriel DW, 2013. *Xanthomonas albilineans* OmpA1 appears to be functionally modular and both the OMC and C-like domains are necessary for leaf scald disease of sugarcane. *MPMI*, 26 (10): 1200–1210.

Article III : Pieretti *et al.* Survie épiphyte de la souche XaS3 (article en cours de préparation).

Surface polysaccharides and quorum-sensing are involved in survival of *Xanthomonas albilineans* on sugarcane leaves

IMENE MENSI¹, ISABELLE PIERETTI¹, DANIEL GARGANI¹, LAURA A. FLEITES², JULIE NOELL¹, FRANCOIS BONNOT¹, DEAN W. GABRIEL², AND PHILIPPE ROTT^{1,*}

¹CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France.

²University of Florida, Plant Pathology Department, Gainesville, FL, USA.

**Correspondence:* Email: pcrott@ufl.edu; Present address: University of Florida, Everglades Research and Education Center, 3200 East Palm Beach Road, Belle Glade, FL 33430, USA.

SUMMARY

Xanthomonas albilineans, the causal agent of sugarcane leaf scald, is a bacterial plant pathogen that is mainly spread by infected cuttings and contaminated harvesting tools. However, some strains of this pathogen are known to be spread by aerial means and are able to colonize the phyllosphere of sugarcane before entering the host plant and cause disease. The objective of this study was to indentify molecular factors involved in survival of *X. albilineans* on sugarcane leaves. We developed a bioassay to test for survival of *X. albilineans* on sugarcane leaves using tissue-cultured plantlets grown *in vitro*. Six mutants of strain XaFL07-1 affected in surface polysaccharide production completely lost their capacity to survive on the sugarcane leaf surface. Surprisingly, these mutants were able to produce more biofilm *in vitro* and accumulated more cellular poly- β -hydroxybutyrate than the wild-type strain. A mutant affected in production of small molecules synthesized by non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) was able to colonize the sugarcane phyllosphere as well as the wild-type strain. However, survival of bacteria on sugarcane leaves varied among mutants of the *rpf* gene cluster involved in bacterial quorum sensing. Therefore, both polysaccharides and quorum sensing were involved in survival of *X. albilineans* on sugarcane leaves.

INTRODUCTION

Prior to entry into plant tissues *via* wounds or natural openings such as stomata and hydathodes, many plant pathogenic bacteria are able to survive as epiphytes on the aerial parts of plants (also called the phyllosphere) without causing any visible symptoms (Hirano and Upper, 2000; Vorholt, 2012). Success of this early phase of foliar colonization is crucial to these pathogens since the occurrence and development of a foliar disease is related to the epiphytic population size of the pathogen (Akhavan *et al.*, 2013; Champoiseau *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 1999). Epiphytic populations can also provide inoculum for subsequent infection of plants or for outbreaks of diseases under appropriate conditions (Hirano and Upper, 2000). Because of the frequent and rapid alteration of environmental conditions on leaf surfaces, the phyllosphere is considered as a harsh habitat in which epiphytic bacteria are confronted by multiple biotic and abiotic stresses, including nutrient limitation, desiccation, UV irradiation and antimicrobial compounds (Hirano and Upper, 2000; Lindow and Brandl, 2003).

Epiphytic bacteria employ common and species-specific strategies that allow them to resist these stresses and adapt to the phyllosphere (Beattie and Lindow, 1999; Lindow and Brandl, 2003; Vorholt, 2012). Aggregation in a structured biofilm is a widely conserved strategy among epiphytic bacteria and is produced by many pathogens for protection against desiccation and other stresses (Danhorn and Fuqua, 2007; Jacques *et al.*, 2005; Monier and Lindow, 2003 and 2004; Rigano *et al.*, 2007). Biofilms are formed when microorganisms attach to a surface and to each other, and together form a matrix of exopolysaccharides (EPS), lipopolysaccharides (LPS), adhesins and DNA in which they are embedded (Danhorn and Fuqua, 2007; Li and Wang, 2011a). Quorum-sensing has been shown to be involved in triggering biofilm formation and consequently in epiphytic survival of foliar pathogens (Guo *et al.*, 2012; Li and Wang, 2011a; Quinones *et al.*, 2005).

Several genes involved in epiphytic survival have been identified in bacterial plant pathogens. Mutants of gene *gumB* (coding for EPS production) of *X. axonopodis* pv. *citri* are no longer able to form biofilms or to survive on citrus leaves (Rigano *et al.*, 2007). The *rpf* gene cluster is involved in regulation of quorum sensing in xanthomonads (Dow, 2008; Ryan and Dow, 2011). Biofilm formation and dispersal, as well as EPS biosynthesis, are controlled by this system which is also directly involved in epiphytic survival of *Xanthomonas* species (Dow *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2007). In *X. campestris* pv. *campestris*, the *rpf* signalling system also regulates the production of a small molecule which is necessary to overcome stomatal closure, a reaction of the plant against invasion of the pathogen (Gudesblat *et al.*, 2009).

Historically, sugarcane leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* was known to be transmitted mechanically by cutting implements, or by planting infected cuttings from symptomless plants (Rott and Davis, 2000). Sordi and Tokeshi reported in 1986, however, that this bacterial species was found in guttation droplets of infected sugarcane and sweet corn leaves, demonstrating that the pathogen was not restricted to internal tissues of the host plant. Unusual symptoms caused by *X. albilineans* were observed in a nursery plot in Guadeloupe (FWI) in 1993 (Daugrois *et al.*, 2012) and reported from Mauritius in 1995 (Autrey *et al.*, 1995), and from Florida, USA in 2001 (Comstock, 2001). These unusual symptoms were attributed to aerial transmission of the pathogen (Comstock, 2001; Daugrois *et al.*, 2003). Furthermore, outbreaks of sugarcane leaf scald that occurred in the late 1980s in Florida were also attributed to new strains of the pathogen that had the propensity to be spread aerially (Davis *et al.*, 1997).

Studies performed by Daugrois *et al.* (2003) and Champoiseau *et al.* (2009) in Guadeloupe clearly showed that *X. albilineans* colonizes the sugarcane canopy before entering the leaves and causing disease symptoms. The molecular mechanisms involved in the establishment of the pathogen on the sugarcane canopy are, however, largely unknown. The objective of this study was therefore to identify molecular factors involved in survival of *X. albilineans* on sugarcane leaves. A simplified bioassay using tissue cultured plants of sugarcane was developed to reproduce survival on leaves of *X. albilineans* wild-type strains. This bioassay was then used to test extent of epiphytic survival of several mutants of the pathogen impaired in capacity to cause disease symptoms or to multiply in the sugarcane stalk (Rott *et al.*, 2011).

RESULTS

A bioassay to study survival of *Xanthomonas albilineans* on sugarcane leaves

In preliminary experiments, four week-old tissue-cultured plantlets of cultivar CP68-1026 were immersed in bacterial suspensions at 10^6 , 10^7 , and 10^8 CFU/mL of *X. albilineans* strains XaFL07-1 and GPE PC73 (Table 1). Foliar imprints of the plantlets were performed on selective growth medium 14 days after inoculation. Extent of epiphytial survival (EES), which was based on growth density in the imprint area, varied in a range between 50 and 59 (on a 0-100 scale) (Fig. 1). No significant difference was found between the two strains of the pathogen and the three inoculum densities. *X. albilineans* strain XaFL07-1 and an inoculum density of 10^7 CFU/mL were chosen for all subsequent experiments.

Surface polysaccharide mutants of *X. albilineans* are not able to survive on sugarcane leaves but overproduce biofilm and accumulate poly- β -hydroxybutyrate

Six mutants of *X. albilineans* unable to produce surface polysaccharides after transposon mutagenesis were identified *in vitro* (Table 1; Rott *et al.*, 2011). Mutations in each of these mutants were located in different genes, including *xanB*, *gmd* and *rmd* (Table 1). Genes *gmd* and *rmd*, as well as ORFs XALc_2705 (coding for a glycosyltransferase of operon *gmd-rmd*) and XALc_2709 (coding for an ABC transporter), were expected to be involved in LPS production since these genes are bordered by genes *etfA* and *metB* (Lu *et al.*, 2008; Pieretti *et al.*, 2012). The texture of colonies of these mutants on MW medium was dry, whereas the

texture of colonies of the wild-type strain was slightly viscous and easily identified when bacteria were sub-cultured on fresh medium with a transfer loop.

Wild-type strain XaFL07-1 of *X. albilineans* and the six polysaccharide mutants were inoculated on tissue cultured plantlets of sugarcane. Fourteen days after inoculation, the mean EES score was 50 for wild-type strain and the mean EES score was only 0.5-5 for the six polysaccharide mutants (Table 2). The wild-type strain of *X. albilineans* produced biofilm that adhered to glass (Fig. 2). All polysaccharide mutants were also able to produce this biofilm, and even more biofilm than the wild-type strain: biofilm amount, as measured by intensity of crystal violet coloration, was significantly higher for 5 of 6 mutants (Fig. 2). Capacity of growth in rich and minimal media of the six mutants was similar or only slightly lower than the wild-type (Fig. 3). No difference in appearance of the external membrane was found between polysaccharide mutant M1116 (Tn5 insertion in gene *rmd*; table 1) and the wild-type parental strain when cells were observed by transmission electron microscopy (Fig. 4). However, mutant M1116 showed many more inclusion bodies expected to contain poly- β -hydroxybutyrate (PHB) than the wild-type strain (Fig. 4).

Plasmid pALB204 harbouring wild-type gene *rmd* (encoding a putative NDP-hexose oxydoreductase) was introduced into mutant M1116 and tested for capacity to restore epiphytic survival of this mutant. Two weeks after inoculation of six sugarcane plantlets per strain, the mean EES score of mutant M1116 complemented with this plasmid was 20, whereas the mean EES score of the mutant and the wild-type strain containing the empty vector (pUFR043) were 0.6 and 50, respectively. Plasmid pALB204 therefore partially complemented the capacity of epiphytic survival of mutant M1116. The texture of colonies of the complemented mutant was also slightly viscous, similar to the wild-type, whereas the texture of mutant M1116 containing the empty vector was dry and easily identified when bacteria were sub-cultured with a transfer loop.

A mutant of *X. albilineans* producing no small NRPS molecules (including no albicidin toxin) is still able to survive on sugarcane leaves

Gene *albXXI* (= *xabA*) encodes a phosphopantetheinyl transferase, an enzyme involved in post-translational activation of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), and is required for albicidin biosynthesis (Huang *et al.* 2000; Royer *et al.* 2004). Mutant Δ *albXXI* M8 does not produce the toxin albicidin and other small NRPS molecules activated by *albXXI* (Rott *et*

al., 2011). Two weeks after inoculation of the sugarcane plantlets, mean EES scores of this mutant and EES of wild-type were identical (Table 3).

The *rpf* gene cluster is involved in survival of *X. albilineans* on sugarcane leaves

The mean EES score of $\Delta rpfF$ mutant M7, which no longer produces the diffusible signal factor (DSF) involved in quorum sensing (Rott *et al.*, 2013) was 50, which was not significantly different from the mean EES score of the wild-type parental strain of 57 (Table 3). Similarly, mean EES scores of $\Delta rpfC$ and $\Delta rpfG$ (which are defective in DSF receptor proteins) were also not significantly different from the mean EES score of XaFL07-1 (Table 3). However, the mean EES of the triple mutant $\Delta rpfGCF$ M15, which lacks simultaneously *rpfF*, *rpfG* and *rpfC*, was significantly lower than mean EES of the wild-type strain: scoring 35 vs. 57, respectively. Mutant $\Delta rpfGCF$ also produced visibly less biofilm than the wild-type strain (data not shown).

Plasmid pPR017Met, harboring wild-type genes *rpfGCF* (Rott *et al.*, 2013), was introduced into mutant $\Delta rpfGCF$ M15 and tested for capacity to restore epiphytic survival. In a first experiment, EES score of the complemented mutant ($\Delta rpfGCF$ M15 + pPR017Met) was similar to the wild-type strain containing the empty vector (pUFR047) for three out of six inoculated plantlets. In a second experiment, EES score of the complemented mutant was similar to the wild-type strain containing pUFR047 for each of six inoculated plantlets (Fig. 5). Plasmid pPR017Met therefore fully restored capacity of epiphytic survival of mutant $\Delta rpfGCF$ M15 on most inoculated sugarcane plantlets. Plasmid pPR017Met also restored and even increased biofilm production of mutant $\Delta rpfGCF$, as measured by intensity of crystal violet coloration (Fig. 6). No significant differences in growth in liquid media was observed between the wild-type strain containing empty vector pUFR047, mutant $\Delta rpfGCF$ containing empty vector pUFR047 and mutant $\Delta rpfGCF$ containing complementing plasmid pPR017Met (Fig. 7).

DISCUSSION AND CONCLUSION

Bacterial surface components such as polysaccharides play a crucial role in epiphytic survival of aerially disseminated pathogens (Bogino *et al.*, 2013; Li and Wang, 2012; Rigano *et al.*, 2007), including *X. albilineans* as demonstrated here. The six different polysaccharide

deficient mutants of the leaf scald pathogen were all greatly impaired in capacity to survive on sugarcane leaves, whether the mutations were monofunctional (involved in EPS or LPS biosynthesis) or bifunctional (involved in EPS and LPS biosynthesis). In numerous bacteria, EPSs are released as an extracellular slime. Because of their highly hydrated and anionic consistency, EPSs help in maintaining a hydrated microenvironment surrounding the bacteria, protecting them from desiccation and thus increasing their survival (Chang *et al.*, 2007). *Xanthomonas* species are known to produce a characteristic EPS called xanthan gum which is encoded by the *gum* gene cluster (*gumB* to *gumM*) (Vorhölter *et al.*, 2008). A *gumB* mutant strain (defective in EPS synthesis) of *X. axonopodis* pv. *citri* is unable to form structured biofilms, and shows compromised survival on leaf surfaces (Rigano *et al.*, 2007). A *gumD* mutant of the same pathogen, which is also altered in EPS production, displayed impaired survival under oxidative stress during stationary phase as well as impaired epiphytic survival on citrus leaves (Dunger *et al.*, 2007).

Xanthan gum is found in almost all *Xanthomonas* species isolated from plants (Gumus *et al.*, 2010); however, it is not found in *X. albilineans*. *X. albilineans* is non mucoid in culture and all *gum* genes are absent from its genome (Pieretti *et al.*, 2009 and 2012). Nevertheless, *X. albilineans* possesses genes *xanA*, *xanB*, *pgi*, *galU* and *ugd* which direct xanthan gum precursor biosynthesis, and *in planta* production of a xanthan-like exopolysaccharide by *X. albilineans* has been reported (Blanch *et al.*, 2008). Therefore, the chemical nature of the EPS involved in epiphytic survival and produced by *X. albilineans* remains to be determined.

Among the six surface polysaccharide mutants impaired in epiphytic survival on sugarcane leaves, four mutants reported herein are predicted to encode lipopolysaccharide (LPS). LPS is the major polysaccharide component on the cell surface of Gram-negative bacteria and is essential for protecting the cell from hostile environments (Newman *et al.*, 2001). In plant pathogenic bacteria, LPS is an important virulence factor that has been increasingly recognized as a major Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) factor (Desaki *et al.*, 2006; Dow *et al.*, 2000; Keshavarzi *et al.*, 2004). Involvement of LPS in biofilm formation and pathogenicity has been demonstrated in animal, human and recently also in plant pathogenic bacteria (Kingsley *et al.*, 1993; Lau *et al.*, 2009; Li and Wang, 2011b and 2012; Yethon *et al.*, 2000). For example, in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, LPS has been shown to play a role in biofilm formation and in epiphytic survival (Li and Wang, 2011b and 2012). Furthermore, a *X. campestris* pv. *campestris* mutant altered in LPS synthesis is strongly affected in its capacity to colonize hydathodes (Hugouvieux *et al.*, 1998). The precise

role of LPS and EPS in survival of *X. albilineans* on sugarcane leaves, as well as in virulence in a broad sense, needs further investigation, especially since LPS genes show great variation among strains of the sugarcane leaf scald pathogen (Pieretti *et al.*, unpublished data).

Surprisingly, and in contrast to other xanthomonads defective in surface polysaccharide production such as EPS xanthan or LPS (for example, Guo *et al.*, 2010; Li and Wang, 2011b; Rigano *et al.*, 2007), mutants of *X. albilineans* missing surface polysaccharides always produced more biofilm than the wild-type strain. Strong attachment of surface polysaccharide mutants to abiotic surfaces does not reflect the phenotype observed on the sugarcane phyllosphere. *X. albilineans* may employ different mechanisms to adhere to these two types of surfaces. The genome of this pathogen contains genes that encode fimbrial and non-fimbrial adhesion proteins that could be involved in attachment to inert surfaces (Pieretti *et al.*, 2012).

Enhanced attachment to abiotic surfaces compared to the wild-type was reported for LPS mutants of *E. coli*, and this phenomenon was attributed to strong cell surface hydrophobicity (Nakao *et al.*, 2012). Furthermore, absence of LPS or EPS may allow other molecules present on the cell surface to be exposed and favor aggregation of bacteria (Bogino *et al.*, 2013). The increased biofilm formation of polysaccharide mutants of *X. albilineans* might also be a stress response related to increased vulnerability of mutated bacterial cells. Mutant M1116 accumulated more inclusion bodies with PHB than the wild-type parental strain and PHB, which are intracellular energy and storage compounds, are known to be produced under nutrient unbalanced condition or otherwise stressful conditions (Kadouri *et al.*, 2003; Wang and Yu, 2007).

Interestingly, small molecules produced by NRPSs do not seem to be involved in the epiphytic survival of *X. albilineans* or adhesion to the leaf. Microbial biosurfactants are surface active metabolites synthesized by NRPS enzymes (Das *et al.*, 2008). Three NRPS genes are essential for cyclic lipopeptide (CLP) antibiotic synthesis in *Pseudomonas fluorescens*, and CLP production plays a key role in biofilm formation in this bacterial species (de Bruijn *et al.*, 2007). The genome of *X. albilineans* contains several NRPS genes, including those involved in the biosynthesis of the phytotoxin and antibiotic albicidin (Pieretti *et al.*, 2009 and 2012). Therefore, if not involved in adhesion, NRPS synthesized molecules of *X. albilineans*, such as those belonging to the albicidin family, may play an essential role in the

capacity of this pathogen to colonize the phyllosphere, and to progress within an environment polluted by other leaf colonizing bacteria (Birch, 2001).

Biofilm development and the interactions between plants and the colonizing bacteria often require a cell-to-cell crosstalk mechanism among the bacteria known as quorum-sensing. It has been shown that quorum-sensing plays a pivotal role in epiphytic survival of several phytopathogenic bacteria including *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *X. axonopodis* pv. *citri* and *X. campestris* pv. *campestris* (Dow *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2012; He *et al.*, 2006; Poplawsky and Chun, 1998; Poplawsky *et al.*, 1998; Quinones *et al.*, 2004 and 2005). Quorum-sensing is adopted by these pathogens to coordinate and regulate the expression of virulence factors, including those required for phyllosphere colonization (i.e. biofilm formation and dispersal, EPS production, motility and chemotaxis).

Quorum sensing involving DSF regulates the production of several pathogenicity factors in xanthomonads (Ryan and Dow, 2011). In *X. albilineans* strain XaFL07-1, DSF appears to play a limited role in pathogenicity (Rott *et al.*, 2013). In contrast, the DSF receptor proteins are involved in control of swimming motility and spread of XaFL07-1 in the sugarcane stalk (Rott *et al.*, 2013). Similarly, absence of DSF production did not impair the capacity of *X. albilineans* to survive on sugarcane leaves. However, when the DSF synthase and the receptor genes were all deleted in a single mutant, the pathogen was affected in capacity to survive on sugarcane leaves. Whether the *rpf* genes control biofilm production or other mechanisms involved in surface attachment of *X. albilineans* remains to be deciphered. In *X. axonopodis* subsp. *citri*, *rpfF*, *rpfC* and *rpfG* control a core group of genes but also unique genes, suggesting broader roles in gene regulation other than transduction of DSF signals (Guo *et al.*, 2012). A similar phenomenon may occur in *X. albilineans*.

To conclude, surface polysaccharides were found to be crucial for establishment of *X. albilineans* on sugarcane leaves. Since these genes are also essential for *in planta* multiplication and invasion (Rott *et al.*, 2011), polysaccharides may be potential targets for screening antimicrobial compounds for leaf scald control. Although probably not as essential, the DSF quorum sensing system also contributes to successful and optimum pathogenicity by *X. albilineans* of sugarcane.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial strains, plasmids and culture conditions

Main characteristics of bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. *Xanthomonas albilineans* strains were cultured routinely at 28°C on modified Wilbrink's (MW) agar medium containing sucrose (10 g), peptone (5 g), K₂HPO₄·3H₂O (0.50 g), MgSO₄·7H₂O (0.25 g), Na₂SO₃ (0.05 g), agar (15 g), distilled water (1 l), pH 6.8-7.0 (Davis *et al.*, 1994). Derivatives of strain XaFL07-1 (from Florida) were produced and cultured on the same medium supplemented with appropriate antibiotics as described below. All strains and mutants of *X. albilineans* were stored at -80°C as turbid water suspensions and retrieved before plantlet inoculation by plating on MW agar medium supplemented with appropriate antibiotics. *Escherichia coli* strains were grown on Luria-Bertani (LB) agar or in LB broth at 37°C, and were used and stored according to standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989). Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin 50 µg ml⁻¹, gentamicin 3 µg ml⁻¹, and kanamycin 20 or 50 µg ml⁻¹ for *X. albilineans* and *E. coli* strains, respectively.

Epiphytic survival bioassay

Tissue-cultured plantlets of sugarcane cultivar CP68-1026 exhibiting 2-4 fully expanded leaves were immersed for 30-40 seconds in a suspension of *X. albilineans* at 10⁷ CFU/mL sterile distilled water. After immersion, plantlets were placed in 200 mm x 20 mm test tubes containing an appropriate nutritive medium (Rott and Chagvardieff, 1984), and incubated in a growth chamber at 28°C with 12 h of light. Two weeks after inoculation, the upper and lower surfaces of leaves were imprinted on WSD selective medium (Davis *et al.*, 1994). The plates were examined for the presence or absence of bacterial colonies of *X. albilineans* after 5 days of incubation at 28°C.

Epiphytic survival was estimated by using a scale ranging from 0 to 6, where 0 = no colonies in the leaf imprint, 1 = 1 to 50 colonies in the leaf imprint, 2 = more than 50 colonies and no confluent growth of bacteria in the leaf imprint, 3 = confluent growth of bacteria less than 10% of the leaf imprint, 4 = confluent growth of bacteria in 10-40% of the leaf imprint, 5 = confluent growth of bacteria in 41-80% of the leaf imprint, 6 = confluent growth of bacteria in 81-100% of the leaf imprint. Extent of epiphytic survival (EES) was expressed as $EES = 100 [(1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4 + 5 \times N_5 + 6 \times N_6) / (6 \times N_T)]$, where N_i = number of the

leaf surfaces with score i and N_T = total number of leaf surfaces per plantlet (Fleites *et al.*, 2013).

Plantlets were inoculated with all strains of *X. albilineans* listed in Table 1 and sterile distilled water as control. In each experiment, six plantlets were inoculated per strain and randomly distributed in the growth chamber. Experiments were performed independently at least two times.

Biofilm formation assay

To analyze the role of genes involved in epiphytic survival on biofilm formation, we performed a colorimetric assay using crystal violet staining of biofilm. *X. albilineans* strain XaFL07-1 and mutants affected in epiphytic survival (polysaccharide mutants and mutant $\Delta rpfGCF$ M15) were each grown in MW medium at 28°C to mid-exponential growth phase (optical density at 600 nm = 0.3-0.4). Bacteria (300 μ l at 10^9 CFU/mL) were then inoculated into 10 ml glass vials containing 3 ml of MW liquid medium supplemented with 5g/l of yeast extract. Stationary cultures (5 replications per strain) were incubated at 30°C for 14 days. Then, liquid cultures were eliminated from vials and remaining biofilm adherent to the glass was stained with 3 ml of a 1% (wt/vol) crystal violet solution. After 15 min of incubation, crystal violet solution was discarded and vials were gently rinsed by addition of 10 ml distilled sterile water three times. Vials were examined visually for the presence of a crystal-violet-stained ring which was indicative of biofilm formation on the walls of the vials. The crystal violet in each vial was then solubilized by adding 3 ml of ethanol (70%). The biofilm cell-associated dye was measured by absorption at 570 nm using a biophotometer.

In vitro* growth of *Xanthomonas albilineans

The growth curves of *X. albilineans* XaFL07-1 and mutants of this strain were determined with 50-ml Corning® tubes containing 10 ml of either MW medium or minimal medium (MM). This later medium contained sucrose (10 g), L-methionine (0.1 g), $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (3 g), NaH_2PO_4 (1 g), NH_4Cl (1 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.3 g), distilled water (1 L), pH 6.8-7.0 (Birch and Patil 1985). Four tubes per strain were inoculated with 100 μ l of a bacterial suspension at 10^9 CFU/mL of sterile distilled water and incubated at 28°C on an orbital

shaker at 150 rpm. Culture samples of 100 µl were taken from each tube every day for 6-8 days and OD600 of bacterial suspensions was measured using a biophotometer.

Complementation of *rmd* mutant M1116 of *Xanthomonas albilineans*

Plasmid pALB204 harbouring gene *rmd* of *X. albilineans* was retrieved from the cosmid library of strain Xa23R1 (Rott *et al.*, 1996). The DNA insert carried by this plasmid corresponds to genome positions 3,198,858 to 3,232,397 of the genome sequence of *X. albilineans* GPE PC73 that was fully sequenced (Pieretti *et al.*, 2009). DNA transfer of pALB204 (or empty shuttle vector pUFR043) between *E. coli* donor and recipient wild-type strain or mutant M1116 of *X. albilineans* (*rmd*::Tn5 derivative of strain XaFL07-1) was accomplished by triparental transconjugation with plasmid pRK2073 as the helper, as described by Rott *et al.* (1996).

Complementation of *rpf* mutant $\Delta rpfGCF$ M15

Plasmid pPR017Met harbouring wild-type genes *rpfGCF* was produced and transferred by electroporation into *rpf* mutant $\Delta rpfGCF$ M15 as described by Rott *et al.* (2013). Plasmid vector pUFR047 was used as a negative control.

Transmission electron microscopy

Bacteria that grew for 2-3 days on Wilbrink's medium were fixed in a 4% glutaraldehyde, 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2), postfixed in 1% osmium tetroxyde, dehydrated using a series of acetone washes, and embedded in TAAB 812 epon resin. Ultrathin sections (60 nm) were mounted on collodion carbon-coated copper grids, contrasted using uranyl acetate and lead citrate, and examined at 80 kV with a transmission electron microscope (Jeol 100CX II).

Statistical analysis

Analyses of variance and statistical comparisons of biofilm and epiphytic survival means were performed using the statistical software package R, version 2.14.1 (R Development Core Team, 2011). Multiple comparisons of means were carried out with Tukey's Honest

Significant Difference method (Miller, 1981) using the function TukeyHSD of the standard R package stats.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marie-Josée Darroussat for excellent technical assistance and Monique Royer for critical reviewing of the manuscript. Imène Mensi was supported by a PhD fellowship from Cirad.

REFERENCES

- Akhavan, A., Bahar, M., Askarian, H., Lak, M.R., Nazemi, A., and Zamani, Z. (2013) Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. *Springer Plus* **2**, 41.
- Autrey, L. J. C., Saumtally, S., Dookun, A., Sullivan, S. and Dhayan, S. (1995) Aerial transmission of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* **21**, 508-526.
- Beattie, G.A. and Lindow, S.E. (1999) Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* **89**, 353–359.
- Birch, R.G., (2001). *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol. Plant Pathol.* **2**, 1-11.
- Birch, R.G. and Patil, S.S. (1985) Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1069-1075.
- Blanch, M., Legaz, M.-E. and Vicente, C. (2008). Xanthan production by *Xanthomonas albilineans* infecting sugarcane stalks. *J. Plant Physiol.*, **165**, 366–374.

Bogino, P.C., de las Mercedes Oliva M., Sorroche F.G. and Giordano W. (2013) The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 15838-15859.

Champoiseau, P., Rott, P. and Daugrois, J. H. (2009) Epiphytic populations of *Xanthomonas albilineans* and subsequent sugarcane stalk infection are linked to rainfall in Guadeloupe. *Plant Dis.* **93**, 339-346.

Chang, W.S., van de Mortel, M., Nielsen, L., Nino de Guzman, G., Li, X. and Halverson, L.J. (2007) Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J. Bact.* **189**, 8290–8299.

Comstock, J. C. (2001) Foliar symptoms of sugarcane leaf scald. *Sugar J.* **64**, 23-32.

Danhorn, T. and Fuqua, C. (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Ann. Review Microbiol.* **61**, 401-422.

Das, P., Mukherjee, S. and Sen, R. (2008) Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: An overview. *Biotechnol. Genetic Engin. Rev.* **25**, 165-186.

Daugrois, J.-H., Dumont, V., Champoiseau, P., Costet, L., Boisne-Noc, R. and Rott, P. (2003) Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. *Eur. J. Plant Pathol.* **109**, 445-458.

Daugrois, J.-H., Boisne-Noc, R., Champoiseau, P., and Rott P. (2012) The revisited infection cycle of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. *Func. Plant. Sci. Biotech.* **6** (Special issue 2), 91–97.

Davis, M. J., Rott, P., Baudin, P. and Dean, J. L. (1994) Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* **78**, 78-82.

- Davis, M. J., Rott, P., Warmuth, C. J., Chatenet, M. and Baudin, P. (1997) Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology*, **87**, 316-324.
- De Bruijn, I., de Kock, M.J.D., Yang, M., de Waard, P., van Beek, T.A. and Raaijmakers, J.M. (2007) Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.* **63**, 417-428.
- De Feyter, R. and Gabriel, D.W. (1991) Use of cloned DNA methylase genes to increase the frequency of transfer of foreign genes into *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *J. Bacteriol.* **173**, 6421–6427.
- De Feyter, R., Yang, Y. and Gabriel, D.W. (1993) Gene-for-gene interactions between cotton *R* genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* *avr* genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 225-237.
- Desaki, Y., Miya, A., Venkatesh, B., Tsuyumu, S., Yamane, H., Kaku, H., Minami, E., and Shibuya, N. (2006) Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1530-1540.
- Dow, M. (2008) Diversification of the function of cell-to-cell signalling in regulation of virulence within plant pathogenic xanthomonads. *Science Signal.* **1(21)**, pe23.
- Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.-Q., Feng, J.-X. and Tang, J.-L. (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signalling and is required for full virulence to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10995-11000.
- Dow, M., Newman, M.A., and von Roepenack, E. (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 241-261
- Dunger, G., Relling, V.M., Tondo, M.L., Barreras, M., Ielpi, L., Orellano, E.G., and Ottado, J. (2007) Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch. Microbiol.* **188**, 127-135.

- Fleites, L.A., Mensi, I., Gargani, D., Zhang, S., Rott, P., and Gabriel, D.W. (2013) *Xanthomonas albilineans* OmpA1 appears to be functionally modular and both the OMC and C-like domains are necessary for leaf scald disease of sugarcane. *Mol. Plant Microbe Interact.* **26**, 1200–1210.
- Gudesblat, E. G., Pablo, S. T., and Adrián, A. V. (2009) *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol.* **149**, 1017-1027.
- Gumus, T., Demirci, A.S., Mirik, M., Arici, M. and Aysan Y. (2010) Xanthan gum production of *Xanthomonas* spp. isolated from different plants. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 201-203.
- Guo, Y., Sagaram, U. S., Kim, J., and Wang, N. (2010) Requirement of the *galU* gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth *in planta* of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2234–2242.
- Guo, Y., Zhang, Y., Li, J.-L., and Wang, N. (2012) Diffusible signal factor-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **25**, 165-179.
- He, Y.-W., Xu, M., Lin, K., Ng, Y.-J. A., Wen, C.-M., Wang, L.-H., Liu, Z.-D., Zhang, H.-B., Dong, Y.-H., Dow, J.M., and Zhang, L.-H. (2006) Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol. Microbiol.* **59**, 610–622.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 624–653.
- Huang, G.Z., Zhang, L.H., and Birch, R.G. (2000) Albicidin antibiotic and phytotoxin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase gene. *Gene*, **258**, 193-199.

- Hugouvieux, V., Barber, C.E., and Daniels, M.J. (1998) Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 537–543.
- Jacques, M., Josi, K., Darrasse, A. and Samson, R. (2005) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2008–2015.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E. and Okon Y. (2003) Involvement of the reserve material poly- -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3244-3250.
- Keshavarzi, M., Soylu, S., Brown, I., Bonas, U., Nicole, M., Rossiter, J., and Mans-field, J. (2004) Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**, 805-815.
- Kingsley, M.T., Gabriel, D.W., Marlow, G.C. and Roberts, P.D. (1993) The opsX locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide. *J. Bacteriol.* **175**, 5839-5850.
- Lau, P.C.Y., Lindhout, T., Beveridge, T.J., Dutcher, J.R. and Lam, J.S. (2009) Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* **191**, 6618-6631.
- Leong, S.A., Ditta, G.S. and Helinski D.R. (1982) Heme biosynthesis in *Rhizobium*: identification of a cloned gene coding for aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* **257**, 8724–8730.
- Li, J. and Wang, N. (2011a) Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. *PloS one* **6**, e21804.

Li, J. and Wang, N. (2011b) The *wxacO* gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. *Mol. Plant Pathol.*, **12**, 381–396.

Li, J. and Wang, N. (2012) The *gpsX* gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Microbiol.* **12**, 381.

Lindow, S.E. and Brandl, M.T. (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1875–1883.

Lu, H., Patil, P., Van Sluys, M.-A., White, F.F., Ryan, R.P., Dow, J.M., Rabinowicz, P., Salzberg, S.L., Leach, J.E., Sonti, R., Brendel, V., and Bogdanove, A.J. (2008) Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PloS One* **3**, e3828.

Miller, R. G. (1981) Simultaneous Statistical Inference, 2nd ed. New York: Springer-Verlag.

Monier, J.M. and Lindow, S.E. (2003). Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *PNAS* **100**, 15977–15982.

Monier, J.M. and Lindow, S.E. (2004) Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 346–355.

Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S.N., and Uhlin, B.E. (2012) Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS ONE* **7(12)**, e51241.

Newman, M.A., Dow, J.M. and Daniels, M.J. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and plant–pathogen interactions. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, 95–102.

Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.A., Lauber, E., Manceau, C., Mangenot, S., Poussier, S., Segurens, B., Szurek, B., Verdier, V., Arlat, M. and Rott P. (2009). The complete genome

sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics* **10**, 616.

Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.A., Lauber, E., Manceau, C., Mangenot, S., Poussier, S., Segurens, B., Szurek, B., Verdier, V., Arlat, M., Gabriel, D.W., Rott, P. and Cociancich, S. (2012) Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC Genomics* **13**, 658.

Poplawsky, A.R. and Chun, W. (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 466-475.

Poplawsky, A.R., Chun, W., Slater, H., Daniels, M.J. and Dow, J.M. (1998) Synthesis of extracellular enzymes, and xanthomonadin in *Xanthomonas campestris*: evidence for the involvement of two intercellular regulatory signals. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 68–70.

Quinones, B., Dulla, G. and Lindow, S.E. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**, 682–693.

Quinones, B., Pujol, C.J. and Lindow, S.E. (2004) Regulation of AHL production and its contribution to epiphytic fitness in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 521–531.

R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rigano, L.A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendín, L., Filippone, P., Torres, P.S., Qüesta, J., Dow, J.M., Castagnaro, A. P., Vojnov, A.A. and Marano, M.R. (2007) Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 1222-1230.

Rott, P. and Chagvardieff, P. (1984) Inoculation de la canne à sucre (*Saccharum sp.*) cultivée *in vitro* avec *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. *L'Agron. Trop.* **39**, 89-92.

Rott, P. and Davis, M. J. (2000) Leaf scald. Pages 38-44 in: A Guide to Sugarcane Diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft and A. S. Saumtally, eds. La Librairie du Cirad, Montpellier, France.

Rott, P., Costet, L., Davis, M.J., Frutos, R. and Gabriel, D.W. (1996). At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J. Bacteriol.* **178**, 4590-4596.

Rott, P., Fleites, L., Marlow, G., Royer, M., and Gabriel, D.W., (2011) Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**, 594-605.

Rott, P., Fleites L., Mensi I., Sheppard L., Daugrois J.-H., Dow J. M. and Gabriel D.W. (2013) The RpfCG two-component system negatively regulates the colonization of sugarcane stalks by *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology SGM* **159**, 1149-1159.

Royer, M., Costet L., Vivien E., Bes M., Cousin A., Pieretti I., Savin A., Megessier S., Viard M., Frutos R., Gabriel D.W., and Rott P.C. (2004) Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster containing also several putative modifying, regulatory and resistance genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**, 414-427.

Ryan, R. P. and Dow, J. M. (2011) Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends Microbiol.* **19**, 145-152.

Sambrook, J.C., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.

Sordi, R.A. and Tokeshi, H. (1986) Presence of *Xanthomonas albilineans* in guttation droplets of sugarcane and sweet corn leaves showing leaf scald disease symptoms. Sociedade dos Técnicos Açucareiros do Brasil, **4(Jul./Aug.)**, 60-63.

Torres, P. S., Malamud, F., Rigano, L. A., Russo, D. M., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J. M. and Vojnov, A. A. (2007) Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environ. Microbiol.* **9**, 2101-2019.

Vorholt, J.A. (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews, Microbiol.* **10**, 828-840.

Vorhölter, F.-J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Rückert, C., Schmid, J., Sidhu, V. K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S. A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K. and Pühler, A. (2008) The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J. Biotechnol.* **134**, 33–45.

Wang, J. and Yu, H.-Q. (2007) Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 871-878.

Wilson, M., Hirano, S.S. and Lindow, S.E. (1999) Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1435–1443.

Yethon, J.A., Gunn, J.S., Ernst, R.K., Miller, S.I., Laroche, L., Malo, D. and Whitfield, C. (2000) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *waaP* mutants show increased susceptibility to polymyxin and loss of virulence *in vivo*. *Infect. Immun.* **68**, 4485–4491.

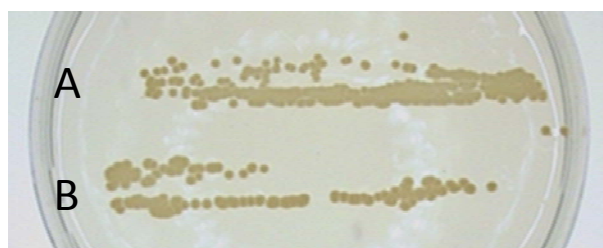


Fig. 1. Growth of *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 in imprints of sugarcane leaves on selective medium two weeks after immersion of leaves in a bacterial suspension at 1×10^8 CFU/mL. A: Upper leaf surface, B: Lower leaf surface.

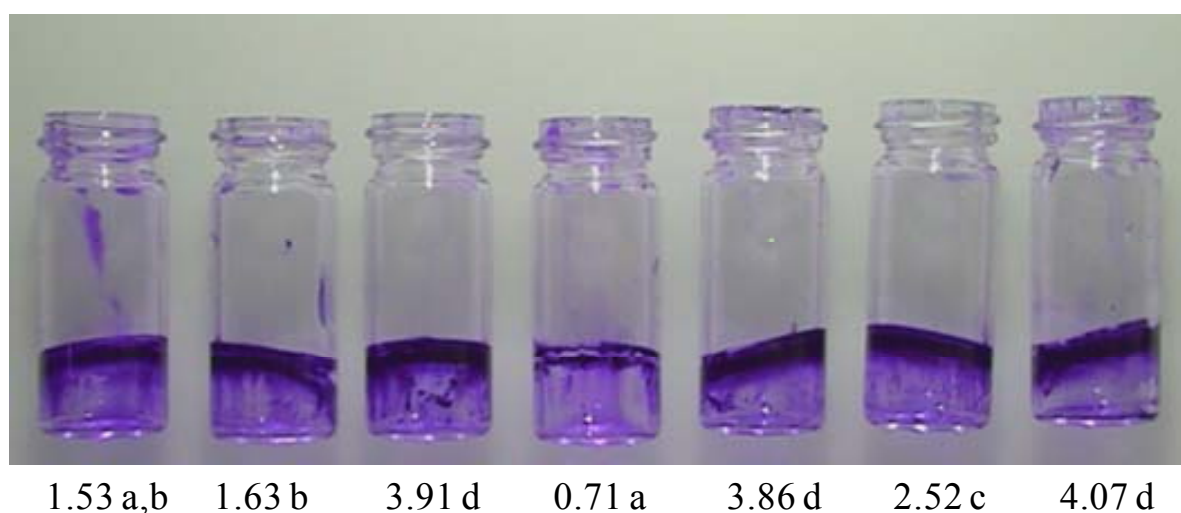


Fig. 2. Formation of biofilm *in vitro* by wild-type strain XaFL07-1 and six polysaccharide mutants (M427, M448, M541, M903, M967, M1116) of *Xanthomonas albilineans*. Biofilm attached to the glass tubes was stained with crystal violet after 14 days of stationary culture in modified Wilbrink medium at 28°C. Data below tubes refer to the mean amount of crystal violet that stayed on tube sides. Values are the means of two independent experiments with five replicates per strain and experiment. Values followed by the same letter are not significantly different according to the test of Tukey ($P < 0.05$).

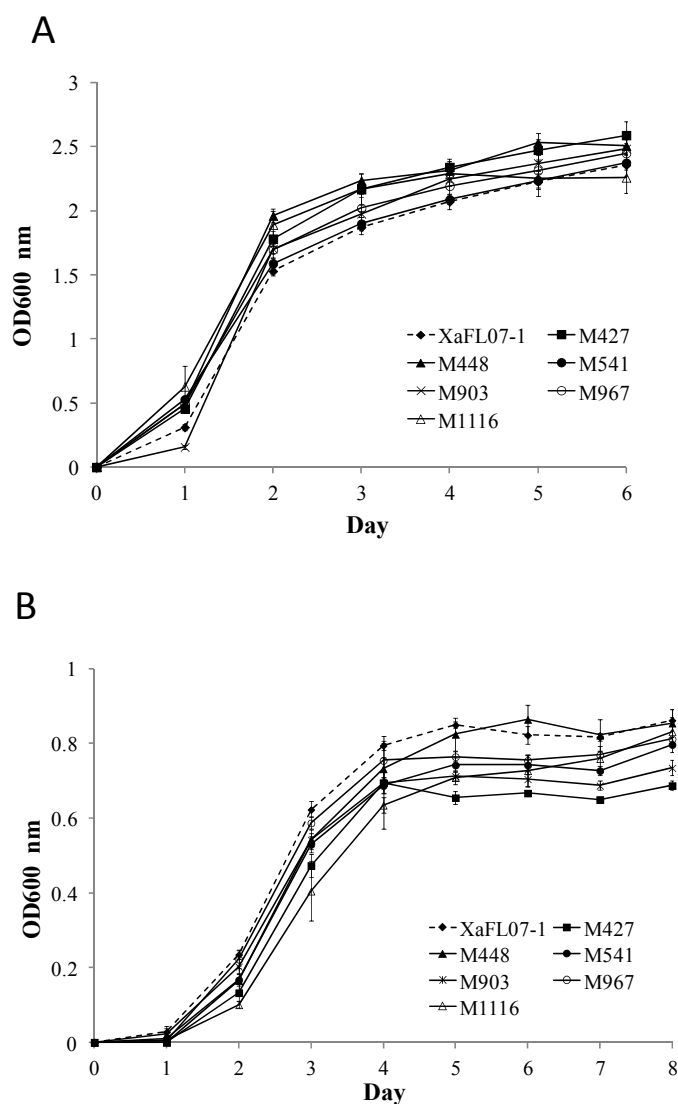


Fig. 3. Growth of *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 (Wild type) and six polysaccharide mutants (M427, M448, M541, M903, M967, M1116) in modified Wilbrink's liquid medium (A) and in liquid minimal medium (B). Growth measured for 6-8 days after inoculation of each medium is expressed as OD 600 nm, and each point represents the mean of four different tubes per strain. Bars represent standard deviation.

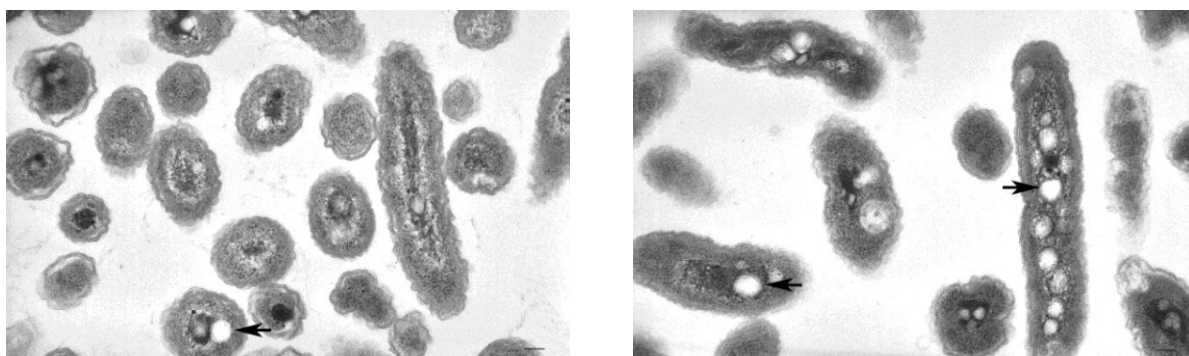


Fig. 4. Cells of *Xanthomonas albilineans* observed by transmission electron microscopy (TEM). A: XaFL07-1 wild-type strain; B: Mutant M1116 (gene *rmd*) deficient in surface polysaccharide production. Arrows indicate inclusion bodies with poly- β -hydroxybutyrate. Bars = 100 nm.

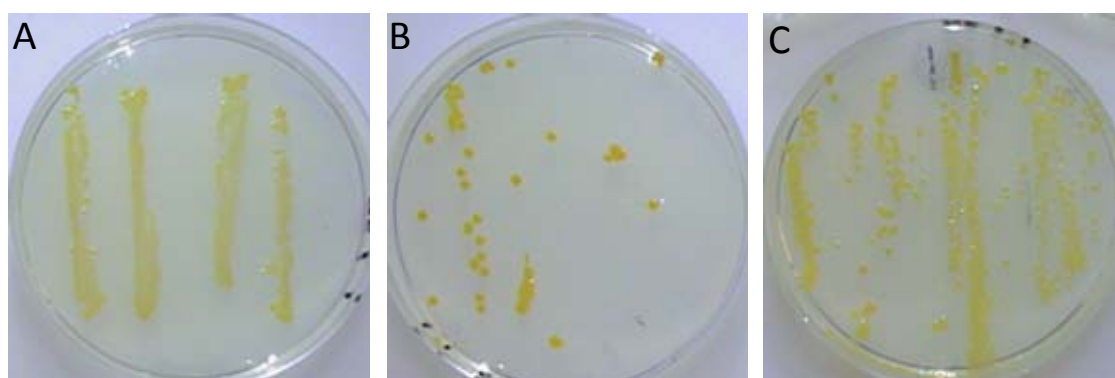


Fig. 5. Growth of *Xanthomonas albilineans* on selective medium after imprinting sugarcane leaves (upper and lower surfaces), two weeks after immersion of leaves in a bacterial suspension at 1×10^7 CFU/mL. A: XaFL07-1 + pUFR047 (wild-type strain XaFL07-1 containing pUFR047); B: Δrpf GCF M15 + pUFR047 (quorum sensing mutant Δrpf GCF M15 containing empty shuttle vector pUFR047); C: Δrpf GCF M15 + pPR017met (mutant Δrpf GCF M15 containing complementing plasmid pPR017Met).

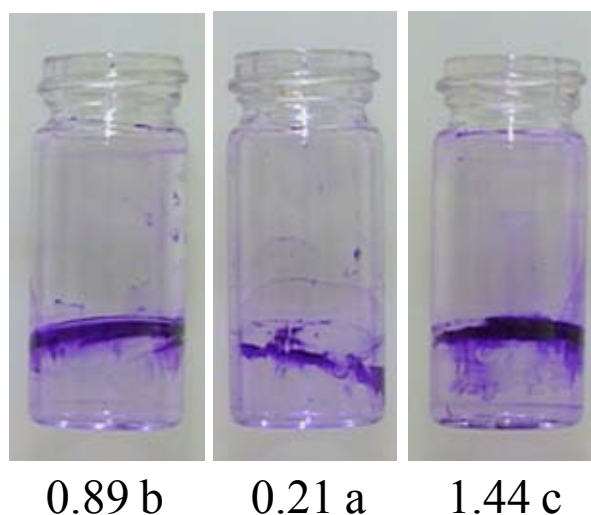


Fig. 6. Formation of biofilm *in vitro* by *Xanthomonas albilineans* strain XaFL07-1 containing empty shuttle vector pUFR047 (A), quorum sensing mutant $\Delta rpfGCF$ M15 containing pUFR047 (B), and mutant $\Delta rpfGCF$ M15 complemented with plasmid pPR017Met (C). Biofilm attached to the glass tubes was stained with crystal violet after 14 days of stationary culture in modified Wilbrink medium + 5 g/l yeast extract at 28°C. Data below tubes refer to the mean amount of crystal violet that stayed on tube sides. Values are the means of two independent experiments with five replicates per strain and experiment. Values followed by the same letter are not significantly different according to the test of Tukey ($P < 0.05$).

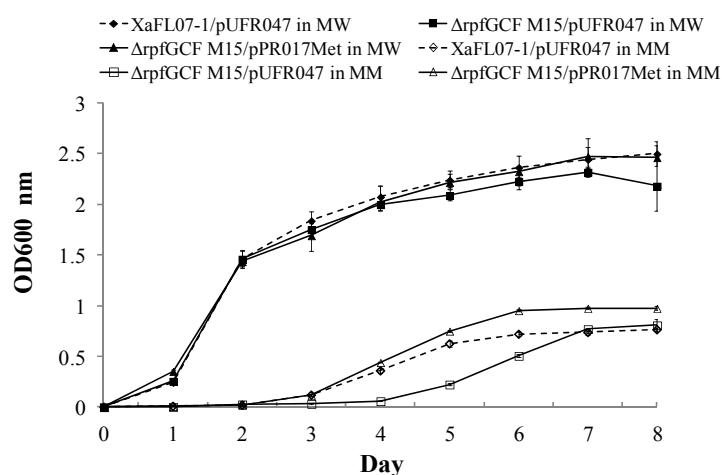


Fig. 7. Growth of *Xanthomonas albilineans* and quorum sensing mutant $\Delta rpfGCF$ M15 (with empty vector pUFR047 or complementing plasmid pUFR017Met) in modified Wilbrink's liquid medium (MW) and in liquid minimal medium (MM). Growth measured for 8 days after inoculation of each medium is expressed as OD 600 nm, and each point represents the mean of four different tubes per strain. Bars represent standard deviation.

Table 1 Plasmids and bacterial strains used in this study.

Plasmid/strain	Relevant characteristics*	Reference/source
Plasmids		
pALB204	pUFR043 containing a 33-kb insert from Xa23R1 including <i>rmd</i> gene, Gm ^r , Kn ^r	Rott <i>et al.</i> (1996)
pUFR043	IncW Mob1 LacZa Gm ^r Nm ^r Cos	De Feyter and Gabriel (1991)
pUFR047	IncW, Mob+, <i>lacZa</i> +, Par+, Gm ^r , Amp ^r	De Feyter <i>et al.</i> (1993)
pPR017	18.3 kb; 9.7 kb <i>Bam</i> HI digested <i>rpfB-prfB</i> fragment from pPYOAAB9CC10 cloned into pUFR047, Gm ^r , Amp ^r	Rott <i>et al.</i> (2013)
pPR017Met	pPR017 transformed into chemically competent cells of <i>E. coli</i> containing pY0AAB27CH12, Cm ^r	Rott <i>et al.</i> (2013)
<i>Escherichia coli</i> strains		
DH5α	F-, <i>endA1</i> , <i>hsdR1</i> 7(rk-,mk+), <i>supE44</i> , <i>λ-thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>phoA</i> , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169	Gibco-BRL
DH5α pRK2073	<i>E. coli</i> containing pRK2013 derivative, Kms (<i>npr</i> ::Tn7) Sp ^r Tra1, helper plasmid	Leong <i>et al.</i> (1982)
<i>Xanthomonas albilineans</i> strains		
GPE PC73	Wild-type strain from Guadeloupe	Pieretti <i>et al.</i> (2009)
XaFL07-1	Wild-type strain from Florida	Rott <i>et al.</i> (2011)
<i>Xanthomonas albilineans</i> derivatives		
M427	<i>xanB</i> ::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in biosynthesis of surface polysaccharides, Kn ^r	Rott <i>et al.</i> (2011)
M448	Glycosyl transferase of the <i>galU</i> operon::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in biosynthesis of surface polysaccharides, Kn ^r	Rott <i>et al.</i> (unpublished)
M541	ABC transporter ATP adhesion protein::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in biosynthesis of surface polysaccharides, Kn ^r	Rott <i>et al.</i> (unpublished)
M903	XALc_2705::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in biosynthesis of surface polysaccharides, Kn ^r	Rott <i>et al.</i> (2011)
M967	<i>gmd</i> ::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in biosynthesis of surface polysaccharides, Kn ^r	Rott <i>et al.</i> (2011)
M1116	<i>rmd</i> ::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in biosynthesis of surface polysaccharides, Kn ^r	Rott <i>et al.</i> (2011)

$\Delta albXXI$ M8	$\Delta albXXI$, defective in production of albicidin and other Non Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) molecules	Rott <i>et al.</i> (2011)
$\Delta rpfF$ M7	$\Delta rpfF$, defective in production of diffusible signal factor (DSF)	Rott <i>et al.</i> (2013)
$\Delta rpfG$ M6	$\Delta rpfG$, defective in DSF receptor protein RpfG	Rott <i>et al.</i> (2013)
$\Delta rpfC$ M29	$\Delta rpfC$, defective in DSF receptor protein RpfC	Rott <i>et al.</i> (2013)
$rpfGCF$ M15	$\Delta rpfF$, $\Delta rpfG$, $\Delta rpfC$, defective in DSF production and receptor proteins RpfG and RpfC	Rott <i>et al.</i> (2013)

* Gmr, Nmr, Ampr, Cmr, Spr, Knr indicate resistance to gentamycin, neomycin, ampicillin, chloramphenicol, spectinomycin, and kanamycin, respectively.

Table 2 Survival on sugarcane leaves of six mutants of surface polysaccharides of *Xanthomonas albilineans* strain XaFL07-1.

Strain of <i>X. albilineans</i>	Extent of epiphytic survival (EES)*
XaFL07-1 (wild-type)	50 b
M427	2 a
M448	4 a
M541	5 a
M903	3 a
M967	2 a
M1116	0.5 a

*on a 0-100 scale (see materials and methods); EES data are the means of 18 sugarcane plantlets per strain and 2-4 leaves per plantlet (data from three independent experiments were combined); values followed by the same letter are not significantly different according to the test of Tukey ($P < 0.05$).

Table 3 Survival on sugarcane leaves of one mutant of small NRPS molecules and four mutants of quorum sensing of *Xanthomonas albilineans* strain XaFL07-1.

Strain of <i>X. albilineans</i>	Extent of epiphytic survival (EES)*
XaFL07-1 (wild-type)	57 b
$\Delta albXXI$ M8	57 b
$\Delta rpfF$ M7	50 a,b
$\Delta rpfG$ M6	62 b
$\Delta rpfC$ M29	63 b
$\Delta rpfGCF$ M15	35 a

*on a 0-100 scale (see materials and methods); EES data are the means of 18 sugarcane plantlets per strain and 2-4 leaves per plantlet (data from three different experiments were combined); values followed by the same letter are not significantly different according to the test of Tukey ($P < 0.05$).

Résultats

Partie 2 : Redéfinition de la localisation de *Xanthomonas albilineans* dans les tissus de la canne à sucre

Partie 2 : REDÉFINITION DE LA LOCALISATION DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS* DANS LES TISSUS DE LA CANNE À SUCRE

Dans les tissus de la plante, les bactéries phytopathogènes se multiplient localement dans les espaces intercellulaires du mésophylle encore appelés apoplaste, et/ou dans les faisceaux vasculaires (xylème ou phloème). Ces tissus représentent, cependant, un vrai champ de bataille dans lequel les bactéries endophytes doivent faire face à une panoplie de mécanismes de défenses complexes, variés et souvent efficaces pour stopper la maladie. Afin d'induire la maladie, les bactéries phytopathogènes ont développé des stratégies sophistiquées pour manipuler les processus clés ayant lieu dans la cellule eucaryote, ce qui leur permet de tirer profit du menu exceptionnel qu'offre la cellule de l'hôte. En se basant sur leurs caractéristiques génomiques et sur leurs modes de nutrition, les bactéries phytopathogènes ont été classées en deux groupes : (i) les entérobactéries responsables des pourritures molles (*D. dadantii* et *Pectobacterium* spp.) sont nommées les "brute force pathogens" (agents pathogènes de forces brutes), alors que (ii) d'autres bactéries comme les pathovars de *P. syringae*, les *Xanthomonas* et *R. solanacearum* (responsables de taches foliaires, de nécroses ou de flétrissement) sont appelées les "stealth pathogens" (agents pathogènes furtifs) (Alfano et Collmer, 1996 ; Davidsson *et al.*, 2013 ; Collmer *et al.*, 2009 ; Rico *et al.*, 2009).

Afin d'acquérir les nutriments et de causer la maladie, la stratégie majeure déployée par les "brute force pathogens" est de dégrader les parois cellulaires. Ces bactéries sécrètent donc dans le milieu extracellulaire un large arsenal enzymatique de dégradation de la paroi végétale *via* le système de sécrétion de type 2 (Charkowski *et al.*, 2012 ; Toth *et al.*, 2003). Quant aux "stealth pathogens", la stratégie centrale qu'ils emploient est de moduler finement les fonctions biologiques de la cellule eucaryote, et notamment les défenses immunitaires mises en place par l'hôte (Grant *et al.*, 2006 ; Poueymiro et Genin, 2009). Cette stratégie repose essentiellement sur la sécrétion d'une multitude de protéines effectrices qui sont injectées directement dans le cytosol de la cellule eucaryote *via* le système de sécrétion de type 3 Hrp. Toutefois, certaines bactéries phytopathogènes comme *Xylella fastidiosa* (une bactérie polyphage) et *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (agent causal du rabougrissement des repousses de la canne à sucre) constituent des exceptions car elles ne peuvent être classées ni dans le groupe des "brute force pathogens", ni dans celui des "stealth pathogens". En effet, ces bactéries ne causent pas les symptômes de pourritures, ne possèdent pas non plus un large arsenal enzymatique de dégradation de la paroi végétale et sont aussi dépourvues du SST3

Hrp (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004 ; Simpson *et al.*, 2000). De plus, contrairement à la majorité des bactéries phytopathogènes qui peuvent coloniser plusieurs niches écologiques (la phyllosphère, les graines, les racines, les tissus de la plante), *Xylella fastidiosa* et *L. xyli* subsp. *xyli* sont exclusivement limitées aux vaisseaux du xylème de leur plante hôte (Bové et Granier, 2002 ; Purcell et Hopkins, 1996). Cette adaptation spécifique est souvent justifiée par le fait que ces bactéries ont un génome réduit (2,6 Mb pour *L. xyli* subsp. *xyli* et 2,7 Mb pour *Xylella fastidiosa*) (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004 ; Lindeberg, 2012 ; Simpson *et al.*, 2000).

Comme *Xylella fastidiosa* et *L. xyli* subsp. *xyli*, l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre, *X. albilineans* a subi au cours de sa spéciation une érosion de son génome. De plus, contrairement à la majorité des bactéries phytopathogènes (y compris les *Xanthomonas*), cette espèce bactérienne est aussi dépourvue du SST3 Hrp (Pieretti *et al.*, 2009 et 2012). Les symptômes causés par *X. albilineans* varient d'une simple ligne blanche à des blanchiments et des nécroses sévères des feuilles infectées, et peuvent conduire finalement à la mort de la plante. Bien que la bactérie induise des changements au niveau des cellules du chlorenchyme (parenchyme chlorophyllien), *X. albilineans* a été considérée jusqu'à très récemment comme une bactérie limitée au xylème de la canne à sucre (Birch, 2001). Cependant, des résultats récents de la littérature suggèrent que cet agent pathogène est capable d'envahir d'autres tissus que le xylème foliaire (Legaz *et al.*, 2011). Afin de vérifier la localisation exacte de *X. albilineans in planta* et d'élucider le rôle de certains gènes candidats de pathogénie dans le processus de colonisation des tissus, des plants de canne à sucre ont été inoculés avec deux souches sauvages (XaFL07-1 et GPE PC73) et douze mutants de *X. albilineans* (Tableau 11) marqués à la protéine fluorescente verte (gfp). Trois approches différentes ont ensuite été utilisées pour préciser la localisation de *X. albilineans* dans les tissus de la canne : (i) la microscopie confocale pour observer les bactéries marquées à la gfp, (ii) l'immunocytochimie et (iii) la microscopie électronique à transmission (MET).

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont été valorisés sous la forme d'un article soumis le 19 juillet 2013 à la revue Open Biology :

Mensi I, Vernerey M-S, Gargani D, Nicole M, et Rott P « Breaking dogmas : the plant pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome ».

Breaking dogmas: The plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome

Imène Mensi¹, Marie-Stéphanie Vernerey¹, Daniel Gargani¹, Michel Nicole² and Philippe Rott^{1,†}

¹CIRAD, UMR BGPI, TA A-54/K, 34398 Montpellier Cedex 5, France

²IRD, UMR RPB, BP 64501, F-34394 Montpellier Cedex 5, France

†Present address: University of Florida, Everglades Research and Education Center, 3200 East Palm Beach Road, Belle Glade, FL 33430, USA.

Author for correspondence:

Philippe Rott

e-mail: philippe.rott@cirad.fr

1. Summary

Xanthomonas albilineans, the causal agent of sugarcane leaf scald, is missing the Hrp type III secretion system that is used by many Gram-negative bacteria to colonize their host. Up until now, this pathogen was considered as strictly limited to the xylem of sugarcane. We used confocal laser scanning microscopy, immunocytochemistry, and transmission electron microscopy to investigate the localization of *X. albilineans* in diseased sugarcane. Sugarcane plants were inoculated with strains of the pathogen labeled with a green fluorescent protein. Confocal microscopy observations of symptomatic leaves confirmed the presence of the pathogen in the protoxylem and metaxylem, however, *X. albilineans* was also observed in phloem, parenchyma and bulliform cells of the infected leaves. Similarly, vascular bundles of infected sugarcane stalks were invaded by *X. albilineans*. Surprisingly, the pathogen was also observed in apparently intact storage cells of the stalk and in intercellular spaces between these cells. Most of these observations made by confocal microscopy were confirmed by transmission electron microscopy. The pathogen exits the xylem following cell wall and middle lamellae degradation, thus creating openings to reach parenchyma cells. This is the first description of a plant pathogenic vascular bacterium invading apparently intact non-vascular plant tissues and multiplying in parenchyma cells.

Key index words: *Xanthomonas albilineans*, confocal laser scanning microscopy, cytochemistry, transmission electron microscopy, non-vascular plant tissue.

2. Introduction

A major sophisticated strategy employed by successful bacterial pathogens is to assault key intracellular host processes to exploit the attractive nutritional menu provided by their eukaryotic hosts, and to evade or suppress host defenses. To achieve this goal, numerous Gram-negative plant and animal pathogenic bacteria rely on a specialized type III secretion system (T3SS) to inject virulence proteins or effectors directly into the cytosol of host cells, and thus allows manipulation of a variety of host cellular processes to their own benefit [1, 2, 3].

In contrast to most Gram-negative pathogenic bacteria, *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald, does not possess a Hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) T3SS [4]. Additionally, this particular species of the *Xanthomonas* genus has a reduced genome (3.8 Mb) in comparison with the other sequenced plant pathogenic

xanthomonads [4, 5]. Bacteria with reduced genomes have often been associated with a high degree of niche specialization and restriction to specific tissues in their hosts [6, 7, 8, 9]. Like *X. albilineans*, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (the causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane), *Xylella fastidiosa* (the causal agent of a lethal disease in numerous hosts) and *Ralstonia syzygii* (the causal agent of Sumatra disease of cloves) have experienced a reduction in genome size during their speciation (2.6 Mb, 2.7 Mb and 3.6 Mb, respectively) [10, 11, 12]. These latter three pathogens are known as fastidious xylem-limited bacteria (XLB) that live exclusively in xylem vessels or tracheary elements [8, 13, 14, 15].

The genome of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (causal agent of citrus huanglongbing) is typical of drastically reduced genomes (1.2 Mb, the smallest genome of all sequenced pathogenic bacteria) [16, 17], and this pathogen is strictly adapted to sieve cells of phloem vessels [18, 19] and salivary glands of citrus psyllids [20], natural vectors of the pathogen. Furthermore, phytoplasmas which are wall-less plant pathogenic bacteria from the class of *Mollicutes*, are limited to the nutrient-rich phloem [21] and are characterized by genome downsizing (0.5-1.3 Mb) [22].

Xanthomonas albilineans generates various leaf and stalk symptoms during disease progress [23, 24]. This pathogen causes the appearance of white, narrow, sharply defined leaf stripes to complete wilting and necrosis of infected leaves, leading to plant death. Up to now, *X. albilineans* was considered as a xylem-limited pathogen based on cytological observations of the pathogen in infected leaf tissues [25, 26]. Even if leaf scald symptoms result from changes in the chlorenchyma cells, *X. albilineans* was considered as constrained within the xylem [26]. However, other observations suggested that, in contrast to *L. xyli* subsp. *xyli*, *X. albilineans* is not limited to the xylem but is also present in surrounding tissues. In 1932, Martin *et al.* [27] reported that, in the stalk of susceptible plants, the pathogen spreads within the xylem, dissolves the cells surrounding the annular vessels of the bundles and thus leads to the formation of lysigenic cavities. Additionally, when imprints of sugarcane stalks infected by *X. albilineans* are made on selective medium, growth of the pathogen is observed on the entire imprint area and not only in the vascular areas (ESM figure 1). Similarly, when infected stalks are used for stalk blot immunoassays, the entire section shows a positive reaction, in contrast to stalks infected by *L. xyli* subsp. *xyli* that show only a positive reaction in the vascular bundle imprints [28].

Recently, observations of semi-thin sections of infected leaves treated with *X. albilineans* anti-serum suggested that the pathogen is not restricted to the xylem but is also present in the epidermal cuticle, epidermal cell walls, guard cells, subepidermal fibers and pericyclic fibers [29]. In order to elucidate the accurate location of the leaf scald pathogen *in planta*, we used herein three different techniques to visualize the bacteria in infected sugarcane tissues: i/ confocal microscopy with fresh material, ii/ confocal microscopy with fixed samples treated with *X. albilineans* anti-serum, and iii/ transmission electron microscopy. We demonstrate that *X. albilineans* is not only able to infect and to move within the xylem, but is also able to invade apparently intact parenchymatous cells, as well as other non-vascular cells, a feature that has not been described for any plant pathogenic bacterium so far.

3. Materials and methods

3.1. Bacterial strains and culture conditions.

Characteristics of bacterial strains and plasmids used in this study are described in table 1. Bacteria were cultured routinely at 28°C on modified Wilbrink's (MW) agar medium containing sucrose (10 g), peptone (5 g), K₂HPO₄·3H₂O (0.50 g), MgSO₄·7H₂O (0.25 g), Na₂SO₃ (0.05 g), agar (15 g), distilled water (1 l), pH 6.8-7.0 [30]. Strains deriving from wild type strains XaFL07-1 (from Florida) and GPE PC73 (from Guadeloupe) were produced and cultured on the same medium supplemented with appropriate antibiotics as described below. All strains and mutants of *X. albilineans* were stored at -80°C as turbid water suspensions and retrieved before preparation of electrocompetent cells or plant inoculation by plating on MW agar medium supplemented with appropriate antibiotics. *Escherichia coli* strains were grown on Luria-Bertani (LB) agar or in LB broth at 37°C, and were used and stored according to standard protocols [31]. Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin 50 µg ml⁻¹, gentamicin 3 µg ml⁻¹, and kanamycin 20 µg ml⁻¹ for *E. coli* strains and *X. albilineans* strains.

3.2. Electroporation of *X. albilineans* with a plasmid conferring constitutive GFP expression.

The *KpnI/SalI* fragment carrying an improved GFP cloning cassette [32] was excised from pUFZ75 and cloned into the same sites of pUFR047 [33] to create pUFR047-GFP (table 1). Plasmid pUFR047-GFP was then introduced into *X. albilineans* by electroporation.

Electrocompetent *X. albilineans* cells were prepared from two-day-old liquid cultures as described by Rott et al. [34]. One to 2 μl of pUFR047-GFP was electroporated into 50 μl of electrocompetent cells of *X. albilineans* in a 0.1 cm gap cuvette at 1.8 kV, 800 Ω , and a capacitance of 25 μF in a GenePulser (Biorad), with a time constant of about 9.2-9.4 ms. Following electroporation, 1 ml of liquid MW was added to the mix and the culture was grown at 28°C for 4 h at 120 rpm. Then, 50- μl aliquots of cultures in liquid MW were spread on MW agar plates containing gentamicin at 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for selection of fluorescent colonies. *In vitro* fluorescence was confirmed by examining cells harvested from selective medium using fluorescent microscopy. Plasmid stability was assessed *in vitro* by transfer on non-selective medium followed by plating on media with and without selective antibiotics. Wild type strains XaFL07-1 and GPE PC73 and all *Xanthomonas* mutant strains listed in table 1 were tagged with GFP using pUFR047-GFP plasmid.

3.3. Inoculation of sugarcane with *X. albilineans*.

Inoculation experiments were conducted at CIRAD, Montpellier, France in a biosafety level 2 (BSL-2) greenhouse using healthy plants derived from disease-free tissue-cultured plantlets of sugarcane cultivars CP68-1026, B69566, R570 and B8008 which are susceptible, moderately susceptible, tolerant and resistant to leaf scald, respectively. Plants were grown in individual 6-liter pots containing a mixture of peat moss and volcanic rock (1:1, vol/vol). Inoculum of *X. albilineans* was prepared from 2-day-old agar cultures and bacterial suspensions were calibrated at 1×10^8 CFU ml^{-1} in sterile distilled water ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.3\text{-}0.4$ corresponding to approx. 1×10^9 CFU ml^{-1}). Six to 15 sugarcane stalks with at least five internodes were inoculated per strain by a modified decapitation method as described by Rott et al. [34]. In this method, the spindle leaves on a stalk were cut off just below the third visible dewlap with pruning shears and 0.2-0.5 ml of inoculum was then deposited onto the cut surface.

Wild type strains XaFL07-1-GFP and GPE PC73-GFP were both inoculated into all four sugarcane cultivars. All mutant strains of *X. albilineans* were inoculated into susceptible

sugarcane cultivar CP68-1026, and sugarcane plants of this cultivar were also inoculated with non GFP-labeled wild type strains of *X. albilineans*, and were used as negative control for GFP detection and positive control for immunolocalization assays. Inoculation of sugarcane plants with GFP marked wild type strains XaFL07-1 and GPE PC73 was repeated independently three times (June-August 2010, 2011 and 2012). Inoculation of sugarcane with mutant strains of *X. albilineans* XaFL07-1 (table 1) was performed once (June-August 2011).

3.4. Localization of bacteria *in planta* by confocal laser scanning microscopy (CLSM).

Emerging symptomatic and inoculated leaves (= leaves with cut extremities), were examined 8-50 days after inoculation (figure 1a). At least five leaves from different sugarcane plants were examined to localize the wild type strains of *X. albilineans* at each sampling date. Three leaves were examined for each mutant strain of the pathogen (table 1). Symptomatic leaves that newly formed after inoculation (= uncut leaves that developed subsequently to inoculated cut leaves; figure 1a) were examined 30-60 days after inoculation. Stalk samples infected by wild type strains XaFL07-1-GFP and GPE PC73-GFP of *X. albilineans* were examined 1-6 months after inoculation and were taken from above, below and at the point of inoculation (Internode I₀ = first internode from the bottom with reduced size after inoculation) (figure 1b).

Sugarcane leaves and stalks were collected immediately prior to sectioning and sample preparation. Sections of fresh leaves and stalks were hand-prepared with a razor blade or obtained using a vibratome (Leica VT1000S). The leaf sections were about 60 µm thick whereas the stalk sections were about 150-300 µm thick. Sections were then mounted on microscope slides in perfluorodecalin (C₁₀F₁₈, 90%; Acros Organics, Fisher Scientific) and directly examined for GFP expression with a confocal laser scanning (CLS) microscope as described below. When sections were to be examined directly and after immunological treatment, each fresh section was divided in two parts: one half was mounted on a microscope slide in perfluorodecalin and directly examined for GFP expression with the CLS microscope, and the other half was stained with antibodies raised against *X. albilineans* [35]. For immunolocalization, all solutions were prepared in phosphate buffer saline (PBS) (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.7 mM, NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM), pH 7.4. Sections of sugarcane leaves or stalks were fixed with paraformaldehyde 4% for 4 h at 4°C. After blocking in 5% bovine serum albumin solution (BSA) for 4 h at room temperature, sections were incubated in the primary antibody solution (a rabbit polyclonal antibody raised against *X. albilineans* diluted

1/800 in BSA 5%) overnight at 4°C. After washing in 0.02% Tween 20, sections were treated with the secondary antibody (an anti-rabbit Alexa594-conjugate; Promega) diluted 1/500 in 5% BSA for 1 h at 37°C. After washing with PBS, sections were mounted in perfluorodecalin and observed with the CLS microscope. Specificity of the labeling was assessed with the following controls performed on sections from healthy and infected leaves and stalks: (i) incubation with the secondary antibody only, (ii) incubation with neither primary antibody (anti-*X. albilineans*) nor secondary antibody.

Observations were carried out using a CLS microscope (Carl Zeiss LSM 700; Jena, Germany). Tissue autofluorescence, GFP and Alexa 594 were excited at 405, 488 and 555 nm respectively. The emission signal was collected using two different tracks. Track 1 was used to visualize the GFP signal (shortpass 524 nm) and the chloroplast autofluorescence (longpass 560 nm). Track 2 was used to collect the cell wall autofluorescence (longpass 420 nm). For immunolocalization observations, fluorescence of Alexa 594 was detected using a 630 nm shortpass filter. The pictures were processed using the Carl Zeiss Confocal Software (Zen, <http://microscopy.zeiss.com>), and they are maximum intensity projections of 3D stacks.

3.5. Localisation of bacteria *in planta* by transmission electron microscopy (TEM).

Leaf and stalk samples (about 2 mm²) were fixed for 4 h in 4% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 at 4°C, and postfixed for 1 h in 1% osmium tetroxyde at 4°C in the dark. Samples were then dehydrated in a graded series of acetone and embedded in Epon resin 812 (TAAB). Ultra-thin sections (60 nm) were mounted on collodion carbon-coated copper grids, contrasted using uranyl acetate and lead citrate, and examined at 80 kV with a transmission electron microscope (Jeol 100CX II).

4. Results

4.1. *Xanthomonas albilineans* multiplies and spreads initially in the xylem of sugarcane leaves

Five-15 days post inoculation (dpi), wild type strains XaFL07-1 and GPE PC73 of *X. albilineans* expressing constitutively a green fluorescent protein (GFP) were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) in xylem vessels (protoxylem and metaxylem) of sugarcane leaves of the susceptible cv. CP68-1026 (figure 2b). Accurate examination of these

infected vessels revealed occurrence of three major and different distributions of the pathogen: (i) aggregated bacterial cells that formed a thin layer of a biofilm-like structure along the protoxylem and/or metaxylem wall (figure 2b), (ii) large aggregates of bacteria that formed a thick layer along the xylem vessels, although individual bacteria still remained in the xylem lumen (figure 2b and ESM figure 2a), (iii) bacteria that were packed together and filled xylem vessels (figure 2e and ESM figure 2b). At this stage of leaf invasion, the fluorescent bacteria were only seen in the xylem.

4.2. *Xanthomonas albilineans* multiplies and spreads in the xylem but also in other tissues of sugarcane leaves

Unexpectedly, 20-60 dpi, wild type strains XaFL07-1 and GPE PC73 of *X. albilineans* were found in tissues other than the xylem. Bacteria were then observed in phloem cells (ESM figures 2c and 2f), in parenchyma sheath cells with chloroplasts (figure 2c and ESM figure 2e), in vascular parenchyma cells (figure 2c), in sclerenchyma (ESM figure 2g) and in bulliform and epidermal cells (figures 2d and 2f). Bacteria were also observed in the vascular bundles and in non-vascular parenchyma cells in the leaf midrib (ESM figure 2d). When bacteria were seen in the phloem, the parenchyma sheath or in bulliform cells, adjacent xylem vessels were not systematically infected (ESM figure 2c). Like in protoxylem and metaxylem vessels, high densities of bacteria sometimes occurred in the phloem, in vascular parenchyma cells and in non-vascular cells.

The same pattern of tissue colonization was also observed in the moderately susceptible B69566 and tolerant R570 sugarcane cultivars after inoculation with the two wild type strains of the pathogen (XaFL07-1 and GPE PC73) labeled with GFP. Additionally, the presence of *X. albilineans* outside of the xylem was also confirmed by immunolocalization (figure 3a) and by transmission electron microscopy (TEM). Furthermore, these different localizations of the pathogen in sugarcane leaf tissues were seen in symptomatic inoculated leaves and in symptomatic non-inoculated leaves that became infected after systemic infection of the sugarcane stalk by the pathogen. No fluorescent bacterial cells (GFP signal or after immunolocalization) were observed in control leaves inoculated with water (figure 2a and figure 3b).

4.3. Pathogenicity mutants of *Xanthomonas albilineans* also multiply and spread in the xylem and in other tissues of sugarcane leaves

To understand the role of some candidate pathogenicity genes during invasion of sugarcane by *X. albilineans*, GFP-labeled mutant strains of *X. albilineans* (table 1) were localized by CLSM in sugarcane leaves of cv. CP68-1026 at 30-60 dpi. Similarly to the wild type strains of *X. albilineans*, the mutant strains affected in surface polysaccharide production, nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) production, diffusible signal factor (DSF) production, the DSF sensor/regulator system, the SPI-1 type 3 secretion system and in outer membrane protein A synthesis were all able to invade xylem vessels, phloem, parenchyma and bulliform cells. However, polysaccharide mutants (4 strains) and the XaOmpA1 mutant were found only in leaf sections that were sampled near the cut leaf surface (leaf top) that is considered to be the entry point of the pathogen after decapitation of the sugarcane stalk and inoculation of sugarcane leaves. These latter mutants invaded only a few vascular vessels in comparison to the wild type strains of *X. albilineans*. This result was not surprising since these mutants are affected in the production of symptoms and in their capacity to spread in the sugarcane stalk [34, 36].

4.4. *Xanthomonas albilineans* multiplies in the vascular system of sugarcane stalks but is not restricted to the xylem

One and two months post inoculation (mpi), the wild type strains XaFL07-1-GFP and GPE PC73-GFP of *X. albilineans* and the mutant $\Delta rpfC$ M29-GFP were seen in xylem vessels (protoxylem and metaxylem) using CLSM, but also in storage parenchymatous tissue of sugarcane stalks of cv. CP68-1026 (figures 4 and 5). Bacteria were found in different internodes from I₄ (= 4th internode below I₀, the first internode with reduced size that grew after inoculation (figure 1b), to the internode just below the apical meristem (up to I₊₂₀).

Different patterns of tissue invasion were found in the sugarcane stalk that suggested the following infection process. At initial vascular invasion of the stalk through colonized inoculated leaves, bacterial cells grow and aggregate to form a thin layer of a biofilm-like structure that adheres to the metaxylem and/or protoxylem wall (figure 4b). At this invasion stage, individual and rod-shaped bacteria that are similar to their free-living form were also seen in the xylem by TEM (figure 4c). After additional growth within the xylem, bacterial

populations became very dense and colonized vessels were filled with bacteria (figures 4d and 4e). A stream of bacterial cells along the xylem vessel was observed by CLSM in longitudinally sectioned samples (ESM figure 3b). At this stage, bacteria were densely packed together and their structure was different when compared to free-living cells. In plugged vessels, transversally sectioned bacteria showed by TEM a polygonal structure (figure 4d) whereas initial free-living bacteria were rod-shaped (figure 4c). Xylem vessels were also frequently partially or completely occluded with a matrix in which bacteria were sometimes seen localized (ESM figure 3a). However, these bacteria were often pale green by CLSM, suggesting that these bacteria were almost dead or metabolically inactive.

As observed by TEM, vascular parenchymatous cells surrounding the invaded xylem vessels generally conserved their integrity and their organelles. However, in some cases, bacteria were viewed in these cells (figure 4e) which were then highly disorganized (no distinguishable organelles) and distorted (loss of turgescence) (figure 4f). Bacteria were also sometimes observed in phloem cells (ESM figure 3d). Infected phloem cells were not heavily altered and organelles were still distinguishable in these cells. However, when compared with the extent of xylem tissue colonization, the phloem elements were rarely seen invaded by the pathogen. Bacteria also occurred in the intercellular spaces between the xylem and the vascular parenchymatous cells (ESM figure 3e). Vascular bundles neighboring infected ones were often not colonized by the bacteria and their morphology and organization appeared similar to healthy vascular bundles.

4.5. *Xanthomonas albilineans* multiplies in the storage tissue of sugarcane stalks

Unexpectedly, cells of *X. albilineans* were also found by CLSM outside the vascular bundles. Bacteria were seen inside storage parenchymatous cells which are located between the vascular bundles. Bacteria occupied initially the cytoplasm of these cells (figure 5a), and then invaded the entire area of the cell, most likely by dissolving the tonoplast (figure 5b and ESM figures 4a and 4b). Bacteria were also found within the intercellular spaces of the storage parenchyma where populations were sometimes very dense as highlighted by a strong GFP signal (figure 5c and ESM figure 4c). In parenchymatous cells starting to be invaded by the pathogen, bacterial cells were only observed along the cell wall facing intercellular spaces, suggesting that the pathogen enters the plant cell at these sites (figure 5d and ESM figure 4d). Infected storage cells were frequently located in the vicinity of invaded vascular bundles but not always, and the bacteria were also observed in storage cells neighboring apparently

bacteria-free xylem. The occurrence of cells of *X. albilineans* in storage parenchymatous cells was confirmed by immunolocalization (figure 6).

During the late stage of the infection (4 to 6 mpi), TEM observations of stalk sections sampled just below the apical meristem suggested extensive bacterial multiplication which was often associated with a fibrillar matrix and ultrastructural destruction of xylem elements. In vascular parenchymatous cells, organelles were highly altered and thus no longer distinguishable. Primary walls were initially degraded (figure 4f and ESM figure 3c) and then locally completely fragmented which enabled the bacteria to spread within the adjacent vessels or cells (ESM figure 3f). Cell or vessel structure disappeared partially or completely and, as a consequence, xylem vessels and parenchyma cells could not be differentiated. These areas became then filled with bacteria and fragments of the cell walls and organelles. In these highly disintegrated areas, phloem cells appeared intact and only few showed signs of degradation.

The same pattern of stalk colonization was also observed in sugarcane cultivars B69566, R570 and B8008 after inoculation with the two wild type strains of the pathogen (XaFL07-1 and GPE PC73) labeled with GFP. However, the number of colonized vascular bundles of the resistant cultivar B8008 (no more than 1% of bundles) was lower than the one in the three other cultivars (more than 10% of bundles). No fluorescent bacterial cells (GFP signal or after immunolocalization) were observed in control stalks inoculated with water (figure 6c).

5. Discussion

Based on microscopy observations using three cytological approaches, we show for the first time that a plant vascular bacterium with reduced genome, supposed to be strictly localized in vessels of the infected host, was also detected in other leaf and stalk tissues. Confocal microscopy, immunocytochemistry, and transmission electron microscopy revealed the occurrence of the sugarcane pathogen *X. albilineans* in xylem elements, phloem, sclerenchyma, epidermal, and various parenchymatous cells.

This finding that *X. albilineans* is able, after invading xylem vessels and multiplying in intercellular areas, to penetrate into apparently intact vascular parenchymatous cells and other non-vascular plant tissues, contradicts the current knowledge regarding the habitat of plant pathogenic bacteria. In contrast to mammalian bacterial pathogens which can invade their host cells [37], cultivable plant pathogenic bacteria are known to spend most of their parasitic life

in xylem elements (vascular pathogens) or in the intercellular areas of the mesophyll tissue (apoplastic pathogens) [38]. Invasive strategy of intracellular mammalian bacterial pathogens, which replicate within spacious phagosome in macrophages, relies on effector proteins delivered by T3SS that allow bacterial uptake into host cells, enhance intracellular replication and remodel the vacuole into a replicative niche [37]. Bacterial plant pathogens have also evolved specific strategies to establish themselves successfully in their hosts and to acquire nutrients from the plant cells [38, 39, 40]. Most Gram-negative plant pathogenic bacteria deploy a Hrp T3SS to inject effector proteins directly into the plant cell cytosol, to interact with various intracellular targets and modulate host cell processes from outside plant cells [41]. The few bacterial plant pathogens which are missing this T3SS have a limited niche in the host plant. It has been proposed that *L. xyli* subsp. *xyli* was once a free-living bacterium that is now restricted to the xylem as a consequence or cause of the loss of functions associated with pseudogenes [10]. Similarly, Simpson and coworkers [12] suggested that the T3SS is not required by *Xylella fastidiosa* because of the insect-mediated transmission and xylem restriction of the bacterium that obviates the necessity of host cell infection. The same explanation was given for phytoplasma which are phloem-restricted microorganisms directly introduced into the phloem cells by their insect vectors [21].

Since the sugarcane pathogen *X. albilineans* is missing the Hrp T3SS and also the genes involved in the biosynthesis of xanthan gum [4], a key pathogenicity factor that protects intercellular *Xanthomonas* species from environmental stresses [42, 43], our results raise a main question: which are the underlying mechanisms that allow *X. albilineans* to invade numerous and diverse host cell types, especially non-vascular tissues? Pieretti *et al.* [5] proposed, on the basis of comparative genomic analyses, that *X. albilineans* most likely uses specific strategies to avoid detection or to protect itself against sugarcane defense mechanisms. This hypothesis is supported by the study showing that the plant nitrogen-fixing endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* produces elicitor molecules that activate the sugarcane defense responses resulting in plant resistance to *X. albilineans* [44].

The mechanisms used by *X. albilineans* to exit the xylem and to invade the parenchyma cells remain to be unravelled. Pathogenicity factors such as albicidin toxin, quorum sensing DSF, outer membrane protein A, SPI-1 T3SS, and surface polysaccharides do not appear to play a direct role in this phenomenon. To exit xylem vessels, *X. albilineans* may cause the rupture of the cell wall by chemical dissolution of vessel primary and secondary walls, and the middle lamellae. Host cell wall alteration observed by TEM in the advanced stage of

sugarcane infection reinforces the idea that the bacteria secrete degrading enzymes that will soften the cell wall thus facilitating the progression of the pathogen toward the adjacent cells. Plant pathogenic bacteria, including species of the genera *Erwinia* [45, 46], *Clavibacter* [47], and *Xanthomonas* [48] were previously described to possess an enzymatic arsenal most likely associated with pathogenesis, and plant cell wall degradation. The genome of *X. albilineans* possesses 19 genes encoding putative cell wall degrading enzymes [5].

Further studies are needed to investigate the role of these enzymes in intracellular invasion of sugarcane cells by *X. albilineans*. Similar studies of pathogenicity factors of other bacterial plant pathogens that experienced genome reduction such as *X. fragariae* [49], or pathogenic *Xanthomonas* species isolated from banana that are missing a Hrp T3SS [50, 51], may also contribute to understand the invasion strategy of plant bacteria that are so far considered as strict vascular pathogens.

6. Acknowledgements

We thank Jeff Jones (University of Florida) for supplying plasmid pUFZ75, and Marie-Josée Darroussat for excellent technical assistance. We also thank Gavin Ash, Stéphane Cociancich, Philippe Roumagnac and Monique Royer for critical reviewing of the manuscript.

References

1. Büttner D, Bonas U. 2002 Port of entry-the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* **10**, 186-192.
2. Büttner D, Bonas U. 2003 Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 312-319.
3. Staskawicz BJ, Mudgett MB, Dangl JL, Galan JE. 2001 Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* **292**, 2285-2289.
4. Pieretti I *et al.* 2009 The complete genome of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics* **10**, 616.
5. Pieretti I *et al.* 2012 Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC Genomics* **13**, 658.

6. Jackson RW, Johnson LJ, Clarke SR, Arnold DL. 2011 Bacterial pathogen evolution: breaking news. *Trends Genet.* **27**, 32-40.
7. Lindeberg M. 2012 Genome-enabled perspectives on the composition, evolution, and expression of virulence determinants in bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**, 111-132.
8. Purcell AH, Hopkins DL. 1996 Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**, 131–151.
9. Chatterjee S, Almeida RPP, Lindow S. 2008 Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 243–271.
10. Monteiro-Vitorello CB *et al.* 2004 The genome sequence of the Gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli subsp. xyli*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **17**, 827-836.
11. Remenant B *et al.* 2011 *Ralstonia syzygii*, the blood diseased bacterium and some asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *PLoS ONE* **6**, e24356.
12. Simpson AJG *et al.* 2000 The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* **406**, 151-157.
13. Eden-Green SJ, Balfas R, Jamalius ST. 1992 Characteristics of transmission of Sumatra disease of cloves by tube-building cercopoids, *Hindola* spp. *Plant Pathol.* **41**, 702–712.
14. Fritschi FB, Lin H, Walker MA. 2008 Scanning electron microscopy reveals different response pattern of four *Vitis* genotypes to *Xylella fastidiosa* infection. *Plant Dis.* **92**, 276-286.
15. Kao J, Damann KE. 1980 'In situ' localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugar cane. *Can. J. Bot.* **58**, 310-315.
16. Duan Y *et al.* 2009 Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus* obtained through metagenomics. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**, 1011-1020.
17. Hartung JS, Shao J, Kuykendall LD. 2011 Comparison of the 'Ca. Liberibacter asiaticus' genome adapted for an intracellular lifestyle with other members of the Rhizobiales. *PLoS ONE* **6**, e23289.
18. Hartung JS, Paul C, Achor D, Bransky RH. 2010 Colonization of dodder, *Cuscuta indecora*, by 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and 'Ca. L. americanus'. *Phytopathology* **100**, 756–762.

- ## Résultats

-
32. Zhang Y, Callaway EM, Jones JB, Wilson M. 2009 Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. *Eur. J. Plant Pathol.* **124**, 379–390.
 33. De Feyter R, Yang Y, Gabriel DW. 1993 Gene-for-gene interactions between cotton *R* genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* *avr* genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 225–237.
 34. Rott P, Fleites L, Marlow G, Royer M, Gabriel DW. 2011 Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 594–605.
 35. Rott P, Davis MJ, Baudin P. 1994 Serological variability in *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald disease of sugarcane. *Plant Pathol.* **43**, 344–349.
 36. Fleites L, Mensi I, Gargani D, Zhang S, Rott P, Gabriel DW. 2013 *Xanthomonas albilineans* XALc_0557 is functionally modular and both the OMC and OmpA C-like domains are necessary for leaf scald disease of sugarcane. *Mol. Plant Microbe Interact.* (in press).
 37. Brett Finlay B, Cossart P. 1997 Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**, 718–725.
 38. Kukel B, Chen Z. 2006 Virulence strategies of plant pathogenic bacteria. In *The Prokaryotes*, pp. 421–440 (eds M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer). New York: Springer Science.
 39. Rico A, Jones R, Preston GM. 2009 Adaptation to the plant apoplast by plant pathogenic bacteria. In *Plant pathogenic bacteria: Genomics and molecular biology*, pp. 63–89 (ed. WJ Robert). Whiteknights, Reading UK: School of Biological Sciences.
 40. Vinatzer BA. 2012 “Listening in” on how a bacterium takes over the plant vascular system. *MBio* **3**, e00269–12.
 41. Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dang JL. 2006 Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 425–449.
 42. Aslam SN. *et al.* 2008 Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr. Biol.* **18**, 1078–1083.
 43. Yun MH, Torres PS, El Oirdi M, Rigano LA, Gonzalez-Lamothe R, Marano MR, Castagnaro AP, Dankert MA, Bouarab K, Vojnov AA. 2006 Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol.* **141**, 178–187.

-
44. Arencibia AD, Vinagre F, Estevez Y, Bernal A, Perez J, Cavalcanti J, Santana I, Hemerly AS. 2006 *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicits a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. *Plant Signal Behav.* **1**, 265-273.
 45. Barras F, Gijsegem VF, Chatterjee AK. 1994 Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 201-234.
 46. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Nasser W, Reverchon S. 1996 Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 213–257.
 47. Benhamou N. 1991 Cell surface interactions between tomato and *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*: localization of some polysaccharides and hydroxyproline-rich glycoproteins in infected host leaf tissues. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **38**, 15–38.
 48. Boher B, Kpemoua K, Nicole M, Luisetti J, Geiger JP. 1995 Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: Cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology* **85**, 777-788.
 49. Vandroemme J, Baeyen S, Cottyn B, de Vos P, Maes M. 2012 Draft genome sequencing of *Xanthomonas fragariae* reveals reduced genome size and distinct virulence gene content. In *Book of abstracts*, p10. 4th Xanthomonas Genomics Conference, July 9-12, 2012. Angers, France: INRA.
 50. Studholme DJ, Wasukira A, Paszkiewicz K, Aritua V, Thwaites R, Smith J, Grant M. 2011 Draft genome sequences of *Xanthomonas sacchari* and two banana-associated xanthomonads reveal insights into the *Xanthomonas* group 1 clade. *Genes* **2**, 1050-1065.
 51. Studholme DJ, Wasukira A, Paszkiewicz K, Aritua V, Thwaites R, Smith J, Grant M. Correction: Studholme *et al.*, Draft genome sequences of *Xanthomonas sacchari* and two banana-associated xanthomonads reveal insights into the *Xanthomonas* group 1 clade. *Genes* **3**, 88-89.
 52. Marguerettaz M, Pieretti I, Gayral P, Puig J, Brin C, Cociancich S, Poussier S, Rott P, Royer M. 2011 Genomic and evolutionary features of the SPI-1 type III secretion system that is present in *Xanthomonas albilineans* but not essential for xylem colonization and symptom development in sugarcane leaf scald. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 246–259.
-

53. Rott P, Fleites LA, Mensi I, Sheppard L, Daugrois J-H, Dow JM, Gabriel DW. 2013 The RpfCG two-component system negatively regulates the colonization of sugarcane stalks by *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology SGM*, **159**, 1149–1159.

Table 1. Characteristics of plasmids and bacterial strains used in this study.

Strain or plasmid	Relevant characteristics*	Reference or source
Plasmids		
pUFZ75	P _{trp} -TIR- <i>gfp</i> cassette in pUFR034, Kn ^r	[32]
pUFR047	IncW, Mob ⁺ , lacZα ⁺ , Par ⁺ , Gm ^r , Amp ^r	[33]
pUFR047-GFP	<i>KpnI/SalI</i> fragment from pUFZ75 cloned into pUFR047, Gm ^r , Amp ^r	This work
<i>E. coli</i> strains		
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ ,mk ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169	Gibco-BRL
<i>X. albilineans</i> strains		
GPE PC73	wild-type strain from Guadeloupe	[4]
XaFL07-1	wild-type strain from Florida	[34]
<i>X. albilineans</i> derivatives		
M427	<i>xanB</i> ::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in biosynthesis of surface polysaccharides, Kn ^r	[34]
M903	XALc_2705::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in biosynthesis of surface polysaccharides, Kn ^r	[34]
M967	<i>gmd</i> ::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in biosynthesis of surface polysaccharides, Kn ^r	[34]
M1116	<i>rmd</i> ::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in biosynthesis of surface polysaccharides, Kn ^r	[34]
M468	XALc_0557::Tn5 derivative of strain XaFL07-1, defective in outer membrane protein OmpA, Kn ^r	[34]
Δ <i>albXXI</i> M8	Δ <i>albXXI</i> , defective in production of albicidin and other Non Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) molecules	[34]
T3SS SPI-1 <i>xasO</i>	Insertional mutant derivative of strain GPE PC73, defective in injectisome component of the Salmonella pathogenicity island-1 type 3 secretion system (SPI-1 T3SS), Kn ^r , Rif ^r	[52]

T3SS SPI-1 <i>xasM</i>	Insertional mutant derivative of strain GPE PC73, defective in injectisome component of the SPI-1 T3SS, Kn^r , Rif^r	[52]
$\Delta rpfF$ M7	$\Delta rpfF$, defective in production of diffusible signal factor (DSF)	[53]
$\Delta rpfG$ M6	$\Delta rpfG$, defective in DSF receptor protein RpfG	[53]
$\Delta rpfC$ M29	$\Delta rpfC$, defective in DSF receptor protein RpfC	[53]
$\Delta rpfGCF$ M15	$\Delta rpfF$, $\Delta rpfG$, $\Delta rpfC$, defective in DSF production and receptor proteins RpfG and RpfC	[53]

* Amp = ampicillin, Gm = gentamycin, Kn = kanamycin, Rif = rifampicin.

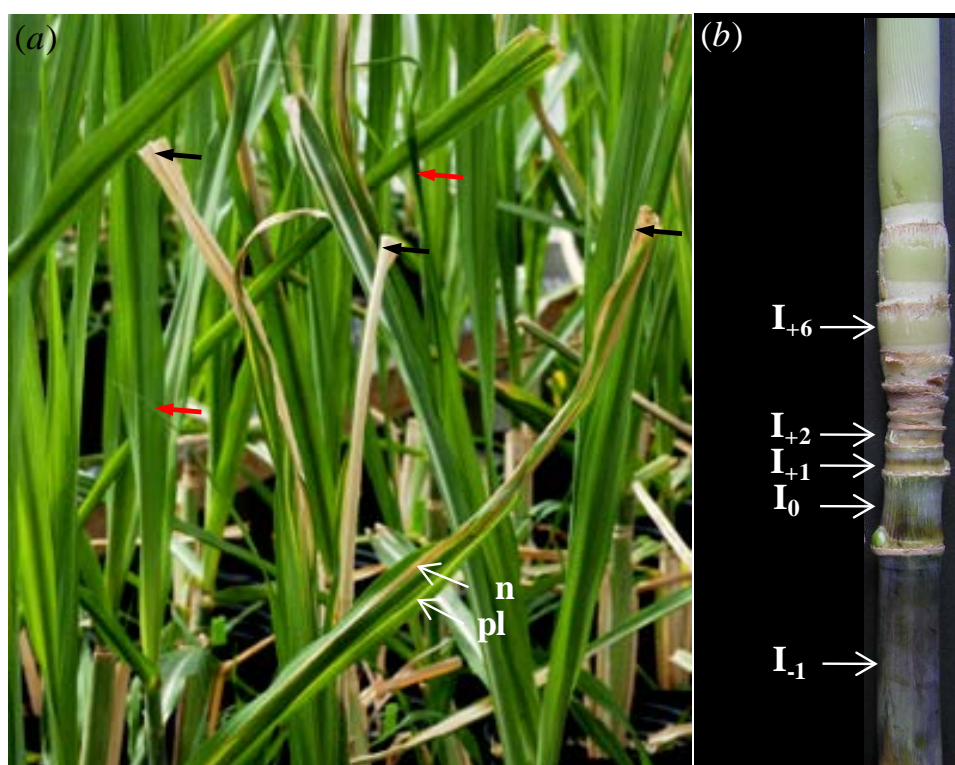


Figure 1. Leaf scald symptoms caused by strain XaFL07-1 of *Xanthomonas albilineans* after inoculation of sugarcane plants by the modified decapitation method [34]. (a) Leaves with cut extremities (black arrows) are inoculated leaves, whereas leaves with uncut extremities (red arrows) are leaves that newly formed after inoculation. Inoculated leaves show pencil line streaks (pl) and necrosis (n) (photograph taken one month post inoculation). (b) Infected sugarcane stalk 2 months post inoculation. Note the reduced size of the internodes above internode I₀ (= first internode from the bottom with reduced size after inoculation). I, internode.

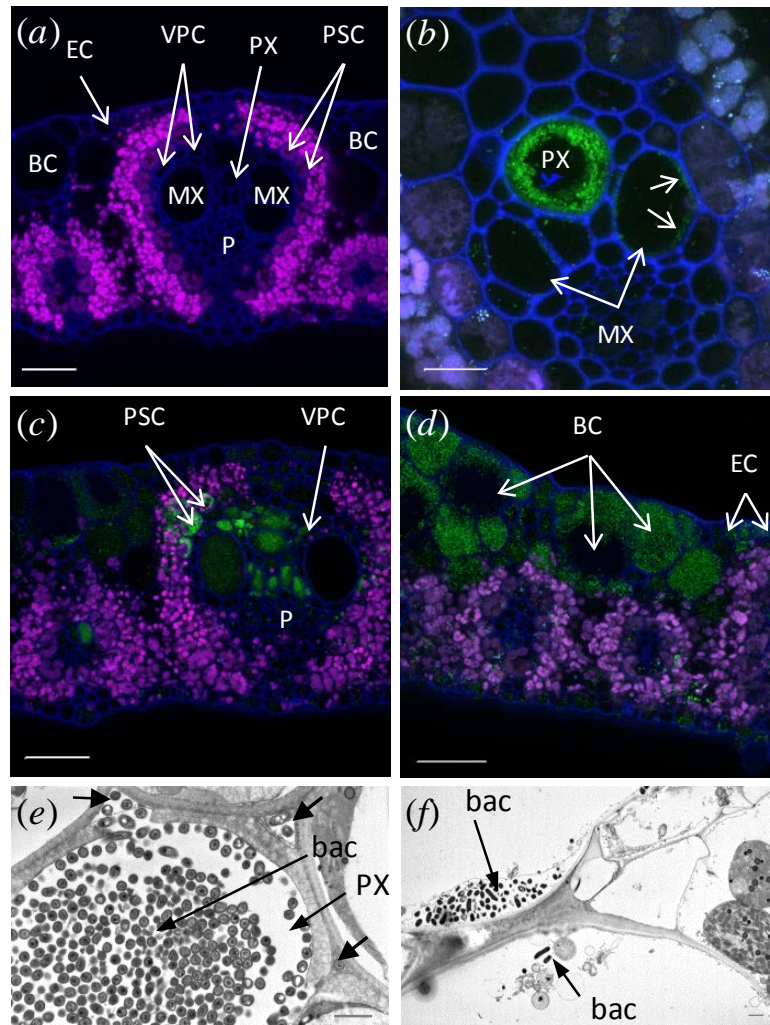


Figure 2. Localization of *Xanthomonas albilineans* in tissues of sugarcane leaves: Confocal microscopic images (*a*, *b*, *c*, *d*) and transmission electron microscopy images (*e*, *f*) of cross sections of sugarcane leaves inoculated with water (*a*) or *Xanthomonas albilineans* (*b-f*). (*a-b*) Images were taken at 5 days post inoculation (dpi). (*c-f*) Images were taken between 20 and 60 dpi. (*a*) Sugarcane leaf blade inoculated with water. Vascular bundles are composed of two metaxylem vessels (MX), protoxylem (PX), phloem (P), and their associated vascular parenchyma cells (VPC). Xylem and phloem tissues are surrounded by a ring of cells called parenchyma sheath cells with chloroplasts (PSC). (*b*) A thin layer of cells of the fluorescent XaFL07-1 (arrows) is seen along the inside of walls of metaxylem cells, whereas bacteria aggregated together and formed a biofilm-like structure along the walls of protoxylem (PX) vessels. (*c*) Cells of the fluorescent strain GPE PC73 present in parenchyma sheath cells with chloroplasts (PSC), and in vascular parenchyma cells (VPC). (*d*) Bulliform (BC) and epidermal cells (EC) show high density of the fluorescent strain XaFL07-1. (*e*) Lumen of a protoxylem (PX) vessel filled with cells of *X. albilineans* (bac). Note the presence of bacteria in the intercellular spaces (thick arrows) close to the vessel. (*f*) Bacteria observed in bulliform cells. Note the presence of bacteria (bac) in the periplasmic space. Scale bars, 50 μm in A, C and D, 20 μm in B, and 1 μm in E and F.

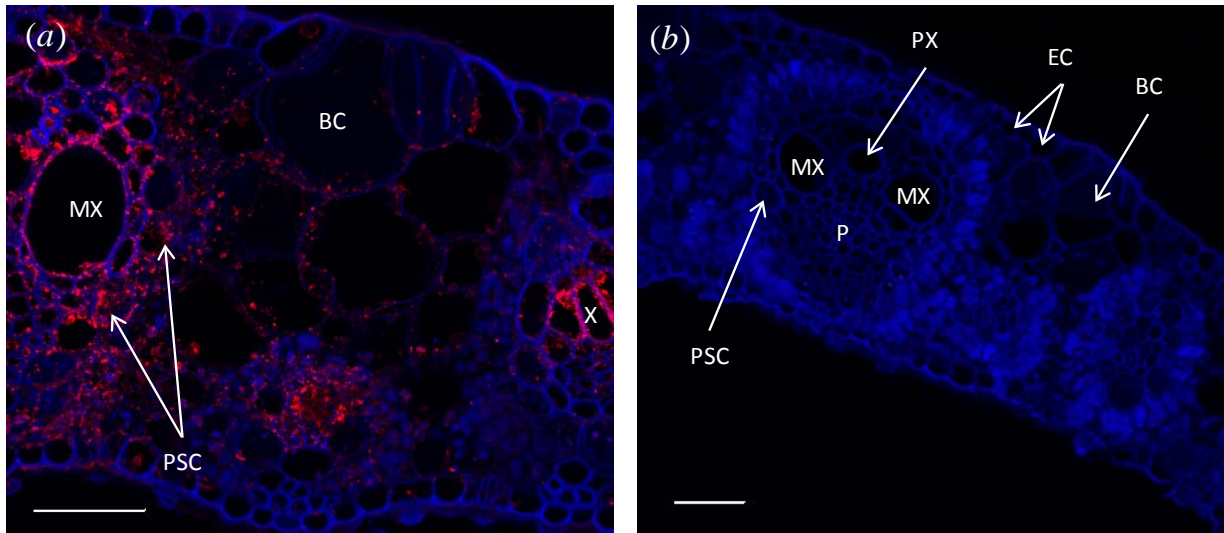


Figure 3. Immunochemistry confirming localization of *Xanthomonas albilineans* in tissues of sugarcane leaves: Confocal microscope images of transverse sections of sugarcane leaf blades inoculated with (a) *X. albilineans* strain GPE PC73 and (b) water (taken at 30 dpi). The sections treated with antibodies raised against *X. albilineans* reveal red-stained bacteria. MX, metaxylem; PX, protoxylem; P, phloem; PSC, parenchyma sheath with chloroplasts; BC, bulliform cell; EC, epidermal cells. Scale bars, 50 μm in a and b.

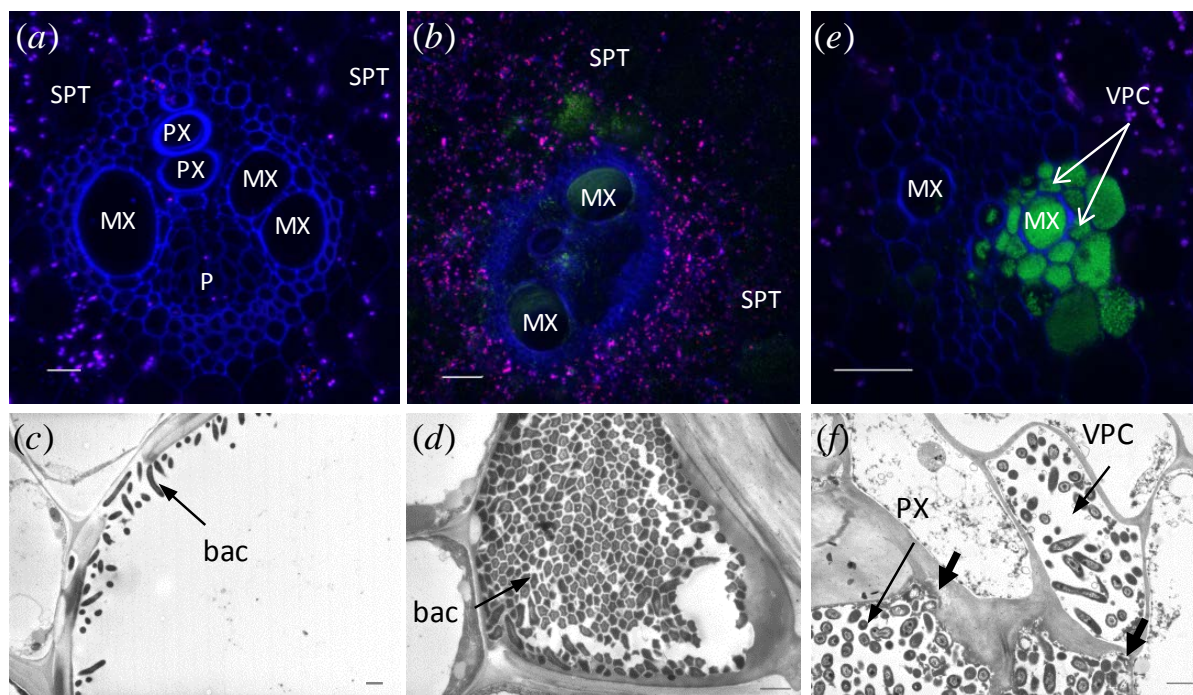


Figure 4. Localization of *Xanthomonas albilineans* in tissues of sugarcane stalks: Confocal microscopic images (a, b, e) and transmission electron microscopy images (c, d, f) of cross sections of sugarcane stalks inoculated with *Xanthomonas albilineans*. Photographs were taken between 2 and 4 months post inoculation (mpi), except f that was taken at 5 mpi. (a) Cross-section of sugarcane stalk inoculated with water showing a vascular bundle and associated storage parenchymatous cells. MX, metaxylem; PX, protoxylem; P, phloem; SPT, storage parenchymatous cells. (b) Cells of the fluorescent strain XaFL07-1 are organized as a thin layer of a biofilm-like structure along metaxylem (MX) vessels. (c) Thin layer of rod-shaped bacterial cells (bac) of strain GPE PC73 along a metaxylem vessel. (d) Densely packed bacteria (strain GPE PC73) in a xylem vessel; bacteria (bac) are no longer rod-shaped but show a polygonal structure. (e and f) Presence of the bacteria (strain XaFL07-1 in e and $\Delta rpfC$ M29 in f) in the vascular parenchyma cells (VPC) surrounding xylem vessels (MX and PX). Thick arrows in f indicate plant cell wall lysis. Scale bars, 20 μm in a, 50 μm in b and e, and 1 μm in c, d and f.

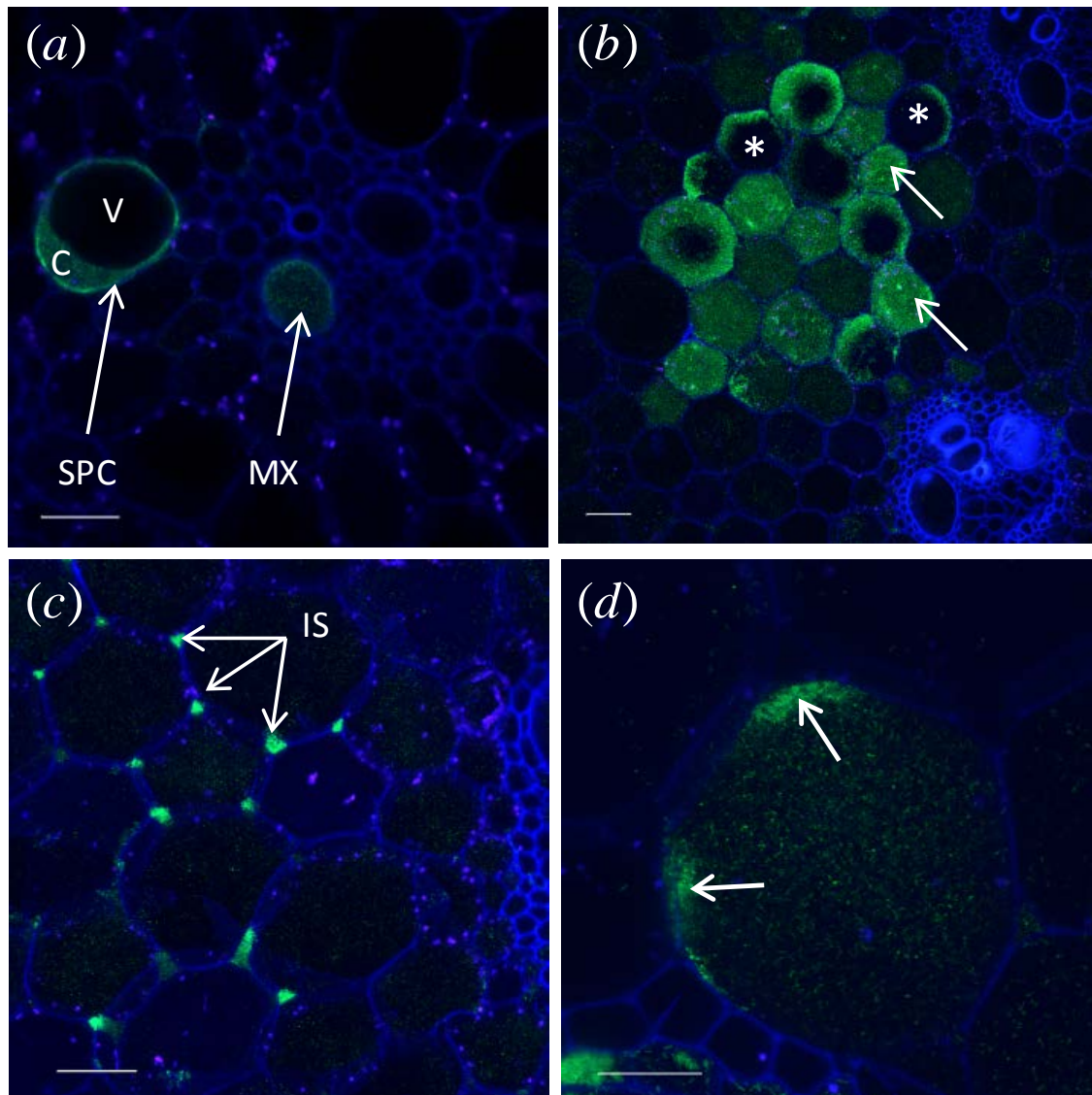


Figure 5. Occurrence of *Xanthomonas albilineans* in storage tissues of sugarcane stalks: Confocal microscope images of cross-sections of sugarcane stalks inoculated with *Xanthomonas albilineans*. Photographs were taken between 2 and 4 months post inoculation. (a) Occurrence of the fluorescent strain XaFL07-1 in a metaxylem vessel (MX) and outside the vascular bundle in a storage parenchymatous cell (SPC). The bacteria occupy the cytoplasm (C) of the storage parenchyma cell but the vacuole (V) appears free of bacteria. (b) Storage parenchyma cells that are completely filled with the fluorescent XaFL07-1 cells (arrows), whereas others are only weakly colonized (asterisks). (c) High densities of bacterial cells (strain GPE PC73) in intercellular spaces (IS) of storage parenchyma cells. (d) Storage parenchyma cell invaded by the fluorescent bacteria (strain XaFL07-1). High population densities are observed along the cell wall facing intercellular spaces (arrows). Scale bars, 50 μm in *a* and *c*, 100 μm in *b*, and 20 μm in *d*.

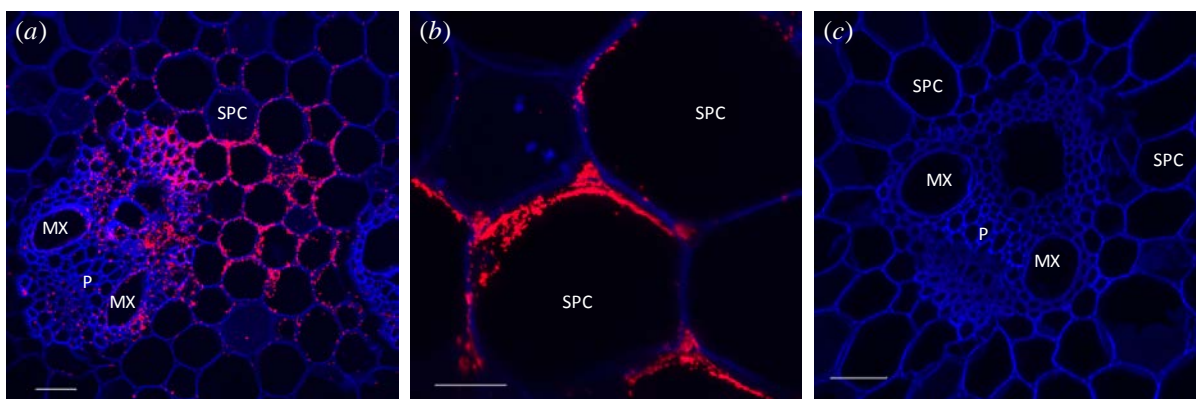
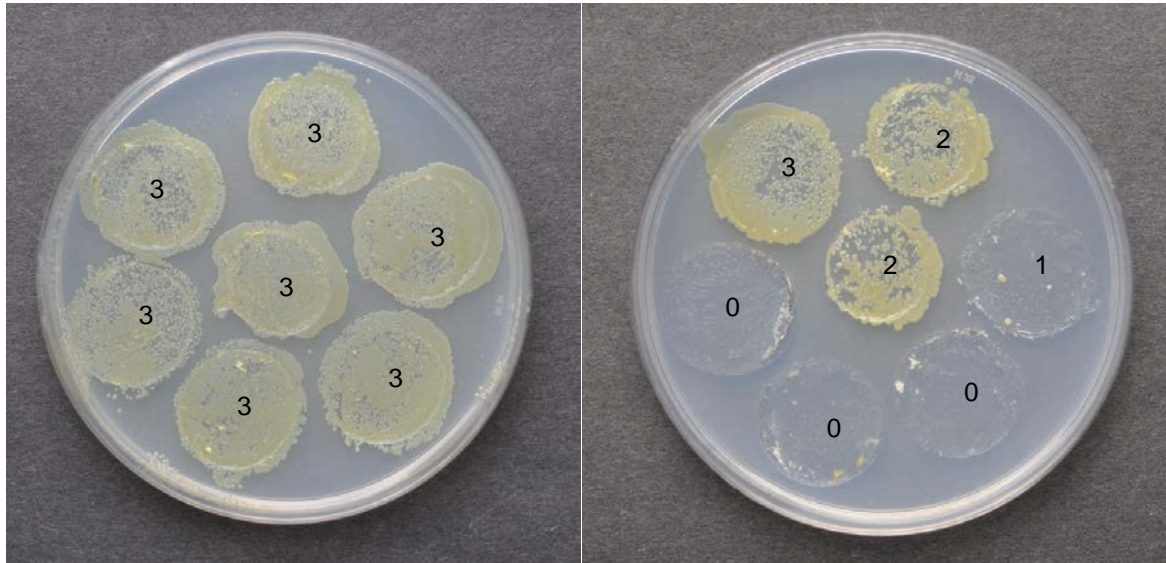
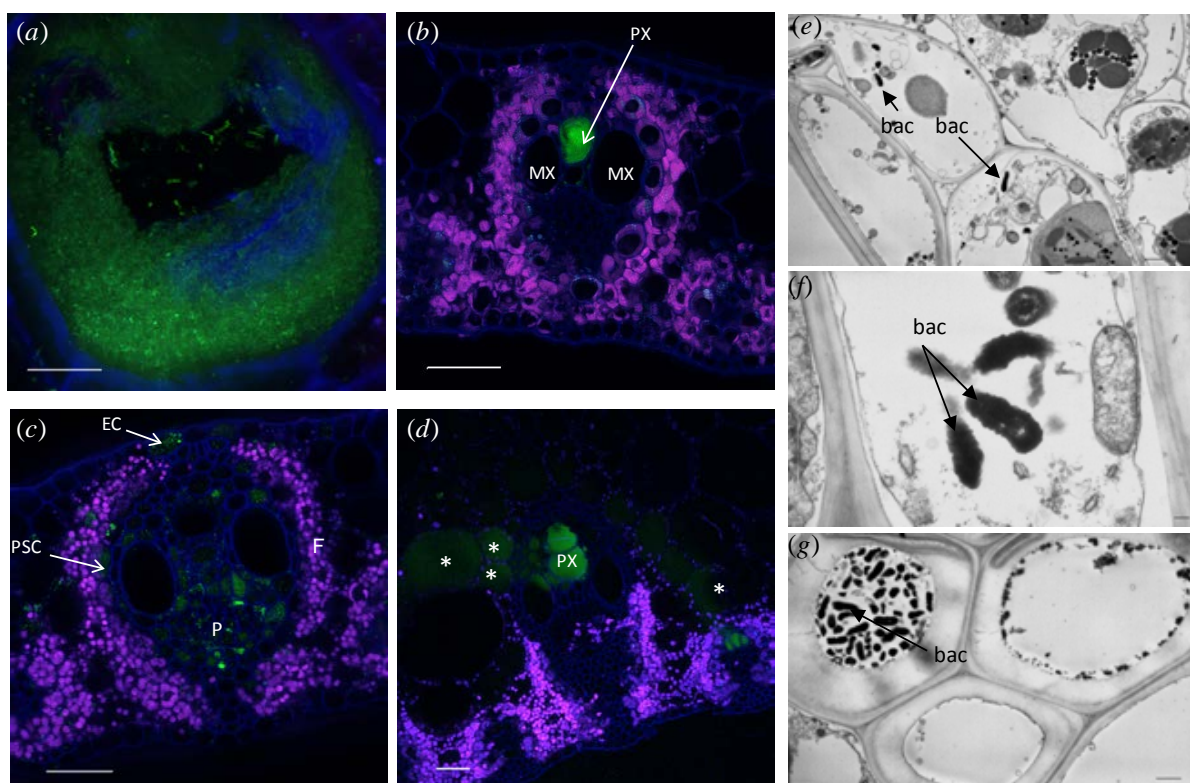


Figure 6. Immunochemistry confirming localization of *Xanthomonas albilineans* in storage tissues of sugarcane stalks: Confocal microscope images of a transverse section of sugarcane stalks inoculated with *Xanthomonas albilineans* strain GPE PC73 (*a-b*) and water (*c*) (taken at 2 months post inoculation). The sections (*a* through *c*) treated with antibodies raised against *X. albilineans* reveal red-stained bacteria. MX, metaxylem; P, phloem; SPT, storage parenchyma tissue. Scale bars, 50 μm in *a* and *c*, and 20 μm in *b*.



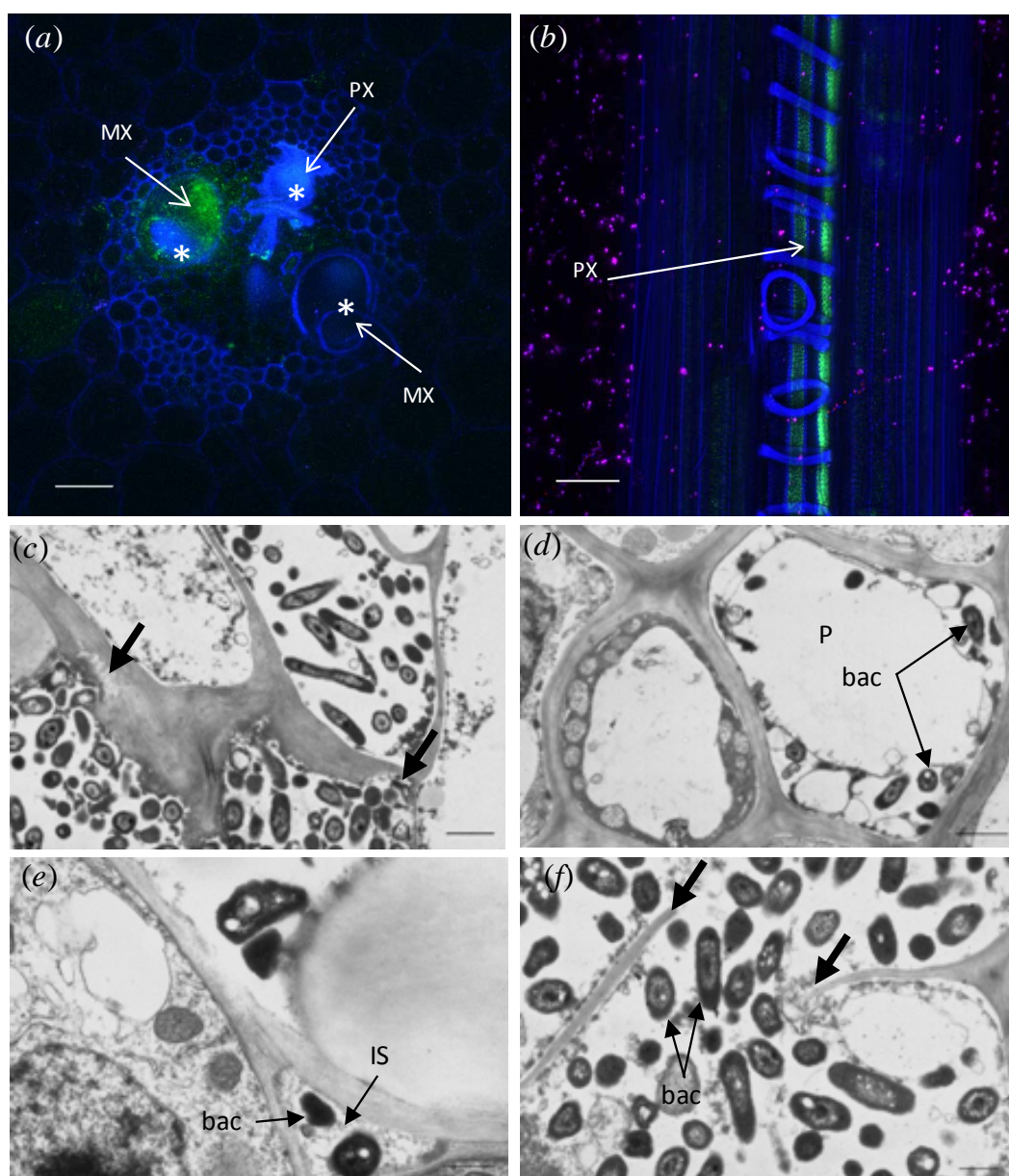
Electronic Supplementary Material (ESM)

ESM Figure 1. Imprints of sugarcane internodes inoculated by *Xanthomonas albilineans* strain XaFL07-1: Growth of *Xanthomonas albilineans* strain XaFL07-1 after inoculation of selective medium by the stalk blot inoculation technique two months post inoculation [34]. Surface sterilized sugarcane stalks were cut transversally, in the middle of internodes, with sterile pruning shears. Each cut sections was firmly pressed onto WCNCB medium (= MW agar medium supplemented with 25 mg/l cephalexin, 30 mg/l novobiocin, 50 mg/l cycloheximide, and 12.5 mg/l benomyl). Growth of *X. albilineans* was recorded after 5 days of incubation of agar plates at 30°C. Growth patterns of the bacteria reveal different distributions and population densities of the pathogen in the stalk: 0 = no bacterial colony in the stalk imprint (absence of the pathogen), 1 = growth of few single colonies in the stalk imprint indicating colonization of few vascular bundles, 2 = growth of numerous single colonies in the stalk imprint suggesting colonization of numerous vascular bundles, 3 = confluent growth of bacteria suggesting colonization of numerous vascular bundles and occurrence of the bacteria outside of the xylem.



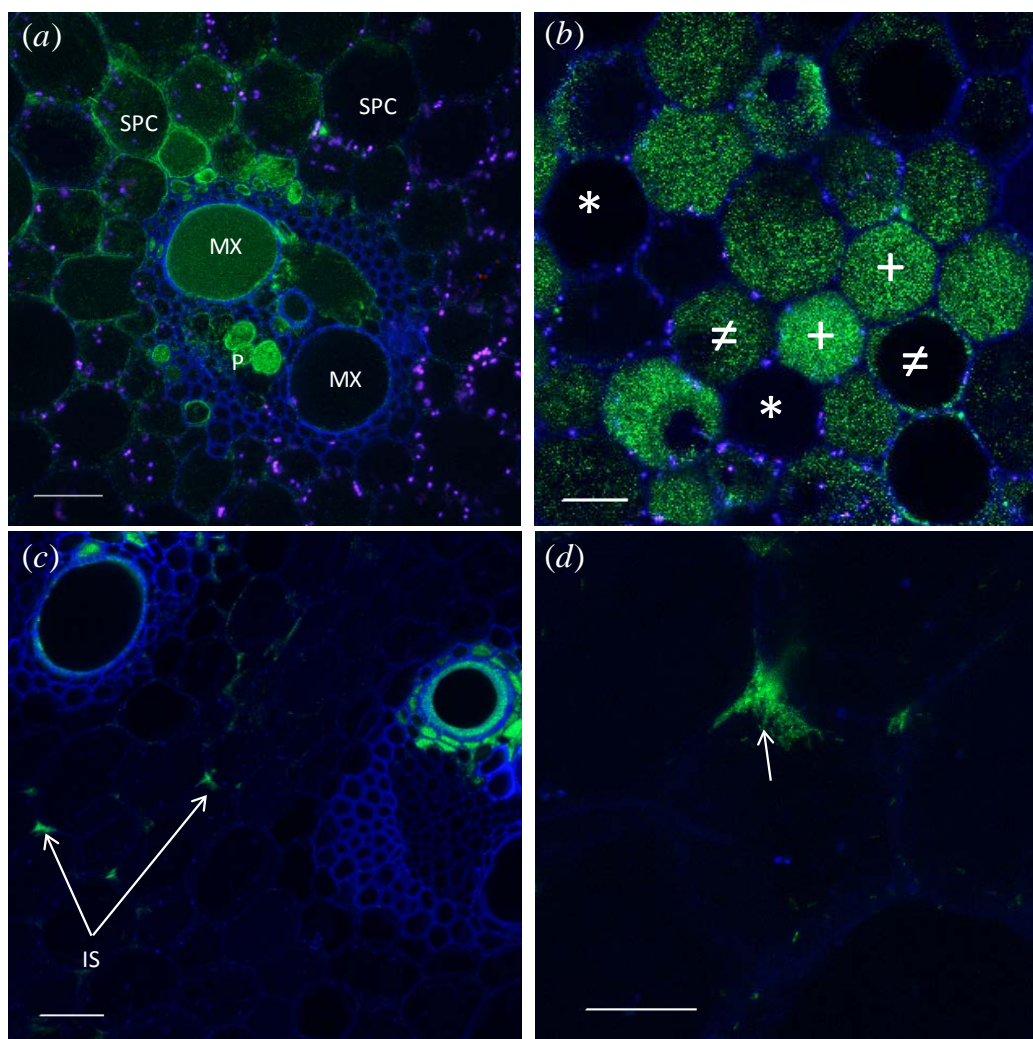
Electronic Supplementary Material (ESM)

ESM Figure 2. Localization of *Xanthomonas albilineans* in tissues of sugarcane leaves: Confocal microscopic images (a, b, c, d) and transmission electron microscopy images (e, f, g) of cross sections of sugarcane leaves inoculated with *Xanthomonas albilineans*. (a-b) Images were taken between 8 and 15 days post inoculation (dpi). (c-g) Images were taken between 20 and 60 dpi. (a) Thick layer of aggregated cells of the fluorescent strain XaFL07-1 of *X. albilineans* against the wall of a metaxylem vessel. (b) The protoxylem (PX) vessel is completely plugged with the fluorescent XaFL07-1 cells. (c) Cells of the fluorescent strain GPE PC73 present in phloem cells (P), parenchyma sheath cells with chloroplasts (PSC) and epidermal cells (EC). (d) Vascular bundles of large and small veins and the parenchyma cells surrounding these bundles (asterisks) of a sugarcane midrib are invaded by cells of GPE PC73. Bacteria (bac; strain GPE PC73) observed in (e) parenchyma sheath cells with chloroplasts, (f) a phloem cell, and (g) sclerenchyma. Scale bars, 10 µm in a, 50 µm in b-d, 1 µm in e and g, and 100 nm in f.



Electronic Supplementary Material (ESM)

ESM Figure 3. Localization of *Xanthomonas albilineans* in tissues of sugarcane stalks: Confocal microscopic images (*a*, *b*) and transmission electron microscopy images (*c*, *d*, *e*, *f*) of cross or longitudinal sections of sugarcane stalks inoculated with *Xanthomonas albilineans*. Photographs were taken between 2 and 4 months post inoculation (mpi), except *c*, *d* and *f* that were taken between 4 and 5 mpi. (*a*) Protoxylem (PX) and metaxylem (MX) vessels partially or completely plugged with a blue-stained matrix (asterisks) in which the fluorescent bacteria (strain GPE PC73) are embedded. (*b*) Longitudinal section showing a stream of the fluorescent strain XaFL07-1 cells along a protoxylem (PX) vessel. (*c*) High magnification of figure 3f showing plant cell wall lysis (arrows) adjacent to bacterial cells. (*d*) A phloem cell (P) filled with bacterial cells (bac) (strain $\Delta rpfC$ M29). (*e*) Occurrence of *X. albilineans* (bac) (strain $\Delta rpfC$ M29) in intercellular spaces (IS) between vascular parenchyma cells. (*f*) Rupture (arrow) in the cell wall of a vascular parenchyma cell filled with bacterial cells (strain $\Delta rpfC$ M29) (bac). Scale bars, 100 μm in *a*, 50 μm in *b*, 1 μm in *c* and *d*, and 0.5 μm in *e* and *f*.



Electronic Supplementary Material (ESM)

ESM Figure 4. Occurrence of *Xanthomonas albilineans* in storage tissues of sugarcane stalks: Confocal microscope images of cross-sections of sugarcane stalks inoculated with *Xanthomonas albilineans*. Photographs taken between 2 and 4 months post inoculation. (a) Vascular bundle [metaxylem (MX) and phloem (P)] and surrounding storage parenchyma cells (SPC) colonized by cells of strain GPE PC73. (b) Storage parenchyma cells that are apparently free of the pathogen (asterisks), partially (\neq) or completely filled (+) with cells of the fluorescent GPE PC73. (c-d) The fluorescent strain XaFL07-1 located in the intercellular spaces (IS) and along the cell wall facing those spaces (arrow). Note that these cells are not yet colonized. Scale bars, 50 μm in a-c, and 20 μm in d.

Discussion et perspectives

Chapitre IV : Discussion et perspectives

L'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre, *Xanthomonas albilineans*, est connu et a été étudié depuis plus d'un siècle. Cependant, jusqu'à ce jour, nous disposons de peu d'éléments concernant les différentes étapes du cycle infectieux de cette bactérie phytopathogène, notamment sa survie en dehors de sa plante hôte et sa localisation précise dans les tissus de la canne à sucre. Les mécanismes impliqués dans ces étapes du cycle infectieux de *X. albilineans* sont également méconnus. C'est pourquoi les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été articulés autour de deux axes : (i) le premier avait pour objectif d'étudier la survie épiphyte de *X. albilineans* et d'identifier les déterminants moléculaires impliqués dans cette étape du cycle de la maladie, et (ii) le deuxième visait à préciser la localisation de *X. albilineans in planta* et à étudier le rôle de certains gènes candidats de pathogénie dans la colonisation des tissus de la canne à sucre.

I/ SURVIE ÉPIPHYTE DE *XANTHOMONAS ALBILINEANS* ET DÉTERMINANTS MOLÉCULAIRES ASSOCIÉS

I.1/Les exopolysaccharides, les lipopolysaccharides et une protéine de la membrane externe : des molécules indispensables pour la survie épiphyte de *X. albilineans*

Afin d'étudier la survie épiphyte de *X. albilineans* et d'identifier les déterminants moléculaires associés, nous avons d'abord mis au point un dispositif miniaturisé permettant de reproduire facilement et relativement rapidement cette phase du cycle infectieux. L'analyse du phénotype de différentes souches sauvages et de différents mutants de *X. albilineans* a été réalisée dans des conditions axéniques et contrôlées en utilisant de jeunes plants de canne à sucre cultivés *in vitro*. Ce travail nous a permis d'étudier le comportement de ces souches et mutants dans un environnement où la bactérie n'est pas soumise à une compétition microbienne. Nous avons ainsi pu montrer que les souches sauvages XaFL07-1 et GPE PC73 de *X. albilineans* sont capables de se maintenir et de survivre en surface des feuilles de canne à sucre, ce qui reflète leur capacité à être transmises par voie aérienne et à coloniser la canopée de la canne à sucre avant de pénétrer dans les tissus de celle-ci. Ces résultats sont tout à fait concordants avec ceux décrits par Champoiseau *et al.* (2009) et Daugrois *et al.* (2003). Ces auteurs ont en effet montré que *X. albilineans*, tout comme la majorité des *Xanthomonas*, peut avoir une phase de développement épiphyte lorsqu'elle est disséminée par

voie aérienne. Par ailleurs, les souches sauvages de *X. albilineans* étudiées au cours de cette thèse appartiennent au groupe génétique PFGE-B (déterminé par la technique d'électrophorèse en champ pulsé) dont les souches ont été directement associées (i) à la capacité d'être disséminées par voie aérienne et (ii) à la recrudescence de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre dans le bassin caribéen au cours des années 1980-1990 (Davis *et al.*, 1997 ; Daugrois *et al.*, 2003 ; Champoiseau *et al.*, 2009).

Grâce à ce dispositif biologique miniaturisé, nous avons réussi à montrer que les polysaccharides de surface (Mensi *et al.*, 2013 ; chapitre III partie 1) et une protéine de la membrane externe OmpA (Fleites *et al.*, 2013 ; annexe 1) sont deux facteurs essentiels et cruciaux pour la survie épiphyte de *X. albilineans* en surface des feuilles. Les mutants de polysaccharides de surface (PS) que nous avons étudiés (à savoir les mutants M427, M448, M541, M903, M967 et M1116) ont été obtenus par mutagenèse aléatoire de la souche sauvage XaFL07-1 (Rott *et al.*, 2011). Les souches M1116, M967, M903 et M541 mutées respectivement au niveau des gènes *rmd*, *gmd*, XALc_2705 (code une glycosyltransférase de l'opéron *gmd-rmd*) et XALc_2709 (code un ABC transporteur) sont prédits être impliqués dans la biosynthèse de LPS car ils sont situés dans un cluster de gènes bordé par les gènes *etfA* ("electron transport flavoprotein") et *metB* ("cystathionine gamma lyase"). Ces deux gènes sont conservés chez tous les *Xanthomonas* dont la séquence est disponible à ce jour et ils sont situés de part et d'autre des clusters de gènes LPS (Lu *et al.*, 2008 ; Pieretti *et al.*, 2012). La souche M427 est mutée au niveau du gène *xanB*. Ce gène est responsable de la biosynthèse d'un sucre nucléotidique précurseur du xanthane (un EPS caractéristique des *Xanthomonas*) et il est également impliqué dans la production de LPS chez *X. campestris* pv. *campestris* (Koplin *et al.*, 1992). La souche M448 est mutée au niveau du gène XALc_1598 qui code une glycosyltransférase de l'opéron *galU*. Comme le gène *xanB*, le gène *galU* est aussi responsable de la biosynthèse de sucre précurseur du xanthane (notamment l'UDP-glucose) (Koplin *et al.*, 1992 ; Vorhölter *et al.*, 2008). Chez *P. syringae* pv. *syringae* et *P. aeruginosa* (responsable de maladies nosocomiales chez l'homme), ce gène est impliqué dans la synthèse de LPS (Deng *et al.*, 2010 ; Priebe *et al.*, 2004).

Qu'ils soient monofonctionnels (c'est-à-dire impliqués dans la production de lipopolysaccharides ou d'exopolysaccharides) ou bifonctionnels (impliqués dans la production des deux), les six mutants de PS étudiés au cours de ce travail perdent complètement leur capacité de survie épiphyte et ne s'attachent plus en surface des feuilles de canne à sucre, au contraire des souches sauvages de *X. albilineans*. Les gènes de PS sont donc

impliqués dans l'attachement et/ou la persistance de la bactérie au niveau de la phyllosphère de la canne à sucre. Toutefois, le rôle précis de ces gènes dans la survie épiphyte de *X. albilineans* reste à élucider. Etant donné que les souches mutées au niveau des gènes de PS ne sont pas affectées dans leur capacité à croître *in vitro* en milieu riche et en milieu pauvre, un rôle de ces derniers dans la fitness de la bactérie est à exclure. Les gènes de PS peuvent avoir soit un rôle dans l'attachement initial à une surface donnée (première étape nécessaire pour la formation d'un biofilm) ou bien un rôle dans la persistance de la bactérie. La perte de la persistance suite à la mutation des gènes de PS pourrait être due à une incapacité à former des biofilms matures et structurés. Les bactéries seraient ainsi affaiblies dans leur capacité à résister à différents types de stress comme la dessiccation, la lumière ou les composés antimicrobiens qui peuvent être sécrétés par la canne à sucre en surface des feuilles. De tels phénotypes ont été observés chez *X. axonopodis* pv. *citri* suite à la mutation d'EPS ou de LPS (Dunger *et al.*, 2007 ; Li et Wang, 2011b et 2012 ; Rigano *et al.*, 2007). La capacité de la souche sauvage et des mutants de PS de *X. albilineans* à adhérer et à former des biofilms en surface des feuilles de canne à sucre constitue donc une perspective de recherche. La capacité des cellules bactériennes à adhérer à la surface des feuilles pourrait être examinée par des colorations au crystal violet et la formation de biofilms vérifiée par microscopie en utilisant des souches bactériennes marquées à l'aide d'une protéine fluorescente, comme cela a été fait pour *X. axonopodis* pv. *citri* (Rigano *et al.*, 2007). Des observations plus fines par microscopie électronique à balayage pourraient aussi être envisagées.

Les EPS sont sécrétés par les bactéries dans le milieu extracellulaire ou forment une capsule autour de ces dernières. Quant aux LPS, ils sont une composante majeure de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Etant donné qu'ils sont exposés en surface, les EPS et les LPS sont considérés comme des barrières physiques dont le rôle est de protéger la cellule bactérienne contre plusieurs stress. De par leur fonction protectrice, les EPS et les LPS permettent de maintenir l'intégrité de la membrane bactérienne et des différents constituants qui y sont rattachés comme le flagelle, les pili de type IV et les adhésines, ainsi que d'autres facteurs de pathogénie (Killiny *et al.*, 2013 ; Michel *et al.*, 2000). L'altération de la membrane bactérienne peut donc affecter plusieurs fonctions biologiques comme la mobilité, l'adhésion, la formation de biofilms, l'assemblage et la sécrétion d'autres facteurs de virulence. Nous avons utilisé la microscopie électronique à transmission pour examiner la morphologie des cellules bactériennes d'un mutant de PS (M1116). La structure membranaire de ce mutant n'est pas apparue altérée, mais une surproduction de granules de poly- β -

hydroxybutyrate (PHB) a été observée, au contraire de la souche sauvage de *X. albilineans* (Mensi *et al.*, 2013 ; chapitre III partie 1). Les bactéries accumulent le PHB, qui est une source de carbone et d'énergie, lorsqu'elles sont sujettes à des conditions de nutrition instables ou à des stress (Gostomski et Bungay, 1996 ; James *et al.*, 1999 ; Muller *et al.*, 1999). Grâce à leur nature anionique, les EPS permettent de maintenir un microenvironnement hydraté autour des bactéries qui les protègent contre différents stress (Chang *et al.*, 2007). Les EPS sont une composante majeure de la matrice entourant les bactéries agrégées en structure de type biofilm et sont requis pour assurer l'intégrité et la maturité du biofilm. Ils jouent ainsi un rôle majeur dans la survie épiphyte des bactéries phytopathogènes foliaires (Kemp *et al.*, 2004 ; Rigano *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 1999).

Les *Xanthomonas* produisent un EPS caractéristique nommé xanthane dont l'assemblage des unités pentasaccharidiques, la polymérisation et l'export dans le milieu extracellulaire sont contrôlés par un cluster de 12 gènes appelés *gum*. *X. albilineans* est à ce jour l'unique espèce connue du genre *Xanthomonas* à ne pas posséder les gènes *gum* et à ne pas produire la gomme xanthane (Pieretti *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant de déterminer la nature chimique des EPS nécessaires pour la survie épiphyte de *X. albilineans*, d'autant plus que la bactérie possède les gènes *xanA*, *xanB*, *pgi*, *galU* et *ugd* qui sont impliqués dans la biosynthèse de sucres précurseurs du xanthane et que les mutants de PS étudiés au cours de ce travail se caractérisent, contrairement à la souche sauvage, par un aspect sec au grattage. De plus, une équipe espagnole a récemment rapporté que *X. albilineans* produit *in planta* une molécule « xanthane-like » qui est plutôt similaire au « xanthane-like » produit par *Xylella fastidiosa* qu'au xanthane *sensu stricto* produit par *X. campestris* (Blanch *et al.*, 2008b ; Legaz *et al.*, 2011). Des quantifications d'EPS sont envisageables, mais il est nécessaire de déterminer d'abord les conditions adéquates permettant à la bactérie de produire ces derniers *in vitro*.

Parmi les six mutants de PS affectés dans leur capacité de survie épiphyte, quatre sont prédits coder des LPS. Si ces mutations affectent des constituants comme la partie O-antigène ou le lipide A des LPS, ceux-ci pourraient être examinés par des techniques biochimiques. Chez les bactéries phytopathogènes, le rôle des LPS dans la survie épiphyte et la formation de biofilms n'a été montré que très récemment chez l'agent causal du chancre citrique, *X. axonopodis* pv. *citri* (Li et Wang, 2011b et 2012). Chez la majorité des bactéries phytopathogènes et notamment chez les *Xanthomonas*, la mutation des EPS ou des LPS se traduit par une altération de la capacité des bactéries à former des biofilms (Dow *et al.*, 2003 ;

Guo *et al.*, 2012; Li et Wang, 2011b et 2012; Rigano *et al.*, 2007). Afin d'étudier ce phénotype chez *X. albilineans*, la capacité des six mutants de PS à former des biofilms a été testée *in vitro* dans des flacons en verre. Remarquablement, ces mutants forment des biofilms beaucoup plus développés et adhèrent plus que la souche sauvage à cette surface abiotique. Ce résultat est assez surprenant, d'autant plus qu'il ne permet pas d'expliquer le comportement de ces mutants en surface des feuilles. En revanche, des propriétés différentes de ces deux surfaces pourraient être à l'origine de ce résultat : (i) la surface foliaire est hydrophobe alors que celle des tubes en verre est relativement hydrophile et (ii) contrairement à la majorité des *Xanthomonas*, *X. albilineans* pourrait utiliser des mécanismes différents pour s'attacher à ces deux types de surface. *X. albilineans* possède plusieurs gènes ayant vraisemblablement un rôle dans l'adhésion comme les adhésines fibrillaires et non fibrillaires (Pieretti *et al.*, 2012). Celles-ci constituent de bons candidats pour étudier l'attachement spécifique de *X. albilineans* aux différentes surfaces et dans la formation de biofilms.

Une différence d'attachement à des supports abiotiques différents (verre et polystyrène) et une augmentation à produire des biofilms a été reportée chez une souche de *Stenotrophomonas maltophilia* mutée au niveau des gènes *rmlA* et *rmlC* impliqués dans la production de LPS (Huang *et al.*, 2006). Ceci est aussi le cas de souches d'*Escherichia coli* mutées au niveau des LPS. Celles-ci forment non seulement des biofilms plus développés mais elles possèdent également une capacité d'auto-agrégation plus élevée que la souche sauvage (Nakao *et al.*, 2012). La mutation des LPS chez *E. coli* modifie l'hydrophobicité de la surface des cellules bactériennes, situation qui peut induire en soit une modification de la capacité des bactéries à adhérer entre-elles et aux surfaces. Une modification des caractéristiques physico-chimiques, et notamment l'hydrophobicité de *X. albilineans*, pourrait donc aussi expliquer le phénotype des mutants de PS chez l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre.

De par leur rôle dans l'installation au niveau de la phyllosphère de la canne à sucre (démonstré au cours de cette thèse), et leur implication dans la multiplication de la bactérie *in planta* et l'apparition des symptômes de maladie (Rott *et al.*, 2011), les EPS et LPS constituent donc de nouveaux déterminants moléculaires du pouvoir pathogène de *X. albilineans*. Leur rôle précis devrait être mieux caractérisé, d'autant plus qu'un polymorphisme important au niveau des gènes LPS a été mis en évidence très récemment entre différentes souches de *X. albilineans* (Royer et Pieretti, communication orale).

Des variations au niveau des LPS pourraient permettre d'expliquer des différences de pathogénie entre souches bactériennes (Mohamed *et al.*, 1996), et peut-être même l'existence de souches très agressives de *X. albilineans* comme celles identifiées récemment au Gabon (Mensi *et al.*, 2013 et annexe 2). Des variations de la composition des LPS pourraient par exemple permettre aux bactéries d'éviter leur reconnaissance par le système immunitaire de la plante hôte (Ojanen *et al.*, 1993; Petrocelli *et al.*, 2012).

De la même façon que les mutants de PS, la mutation **d'une protéine de la membrane externe** nommée XaOmpA1 rend *X. albilineans* quasiment incapable de survivre en surface des feuilles de la canne à sucre. La membrane externe des mutants du gène codant cette protéine a une structure très altérée, rendant probablement ces mutants plus sensibles aux stress, ce qui pourrait expliquer leur comportement en surface des feuilles de canne à sucre (Fleites *et al.*, 2013). L'impact de cette protéine sur la formation de biofilms reste encore à étudier, mais un essai préliminaire que nous avons réalisé a permis de montrer que le mutant XaOmpA produit moins de biofilm que la souche sauvage *in vitro*. Chez les bactéries phytopathogènes, le rôle d'une protéine membranaire OmpA-like n'a été démontré que chez *X. campestris* pv. *campestris*. Ainsi l'inactivation d'OmpA chez cette espèce bactérienne a un effet pléiotropique et induit aussi une altération de l'adhésion de la bactérie en surface des feuilles du chou (Chen *et al.*, 2010). Contrairement à *X. campestris* pv. *campestris*, la mutation de la protéine XaOmpA1 chez *X. albilineans* affecte aussi la capacité de cette dernière à croître en milieu pauvre et en milieu riche. Ce phénotype contribuerait aussi aux difficultés de la bactérie à survivre en tant qu'épiphyte en surface des feuilles et à coloniser sa plante hôte. La protéine XaOmpA1 semble donc plutôt jouer essentiellement un rôle dans la fitness de *X. albilineans* que dans la pathogénie.

I.2/ Rôle des gènes *rpf* (« Regulation of Pathogenicity Factors ») dans la survie épiphyte de *X. albilineans*

Le cluster de gènes *rpf* est lui aussi impliqué dans la survie épiphyte de *X. albilineans*. Quatre souches mutées au niveau des gènes *rpf*, à savoir *rpfF* (impliqué dans la biosynthèse du DSF), *rpfC* (impliqué dans la perception du DSF), *rpfG* (impliqué dans la transduction du signal DSF), et *rpfGCF* ont été évaluées pour leur capacité de survie en surface des feuilles de la canne à sucre. De façon remarquable, la délétion des gènes du système de régulation (*rpfC* ou *rpfG*) n'affecte pas la capacité de la bactérie à survivre en tant qu'épiphyte, alors que

l'inactivation dans un même mutant des trois gènes *rpfF*, *rpfG* et *rpfC* se traduit par une diminution significative de la survie épiphyte de *X. albilineans*. Le mutant au niveau du gène *rpfF* se caractérise, quant à lui, par un phénotype intermédiaire. Ces résultats diffèrent complètement de ceux obtenus suite à la mutation des mêmes gènes chez d'autres *Xanthomonas*. Ainsi, chaque mutation des gènes *rpf* (*rpfF*, *rpfC* et *rpfG*) chez *X. axonopodis* pv. *citri* altère sévèrement la capacité de cette bactérie à survivre en surface des feuilles d'agrumes, à former des biofilms et à provoquer les symptômes du chancre citrique (Guo *et al.*, 2012). Ces résultats confirment, si besoin est, que même si les différents constituants du système de quorum sensing sont conservés chez les différentes espèces de *Xanthomonas*, leurs rôles varient afin de permettre à ces bactéries de coloniser différents hôtes ou des niches spécifiques (Chatterjee *et al.*, 2008a ; Dow, 2008).

De plus, le phénotype le plus sévère observé pour le triple mutant *rpf* nous laisse penser que *rpfF*, *rpfC* et *rpfG* régulent des traits différents et complémentaires chez *X. albilineans*. Ainsi, la mutation d'un de ces gènes n'aurait pas d'effet important sur l'expression d'un ou quelques facteurs de pathogénie particulier et sur la survie épiphyte de la bactérie. En revanche, l'altération concomitante des trois gènes pourrait avoir un effet cumulatif qui affecterait un ou plusieurs traits indispensables à la colonisation de la phyllosphère. Par ailleurs, nous avons montré que le mutant *rpfGCF* est aussi affecté dans sa capacité à former des biofilms *in vitro*, structure indispensable pour la survie des bactéries phytopathogènes comme nous l'avons discuté ci-dessus.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié le rôle du système DSF/RpfGC dans la survie épiphyte et la formation de biofilm, mais bien d'autres phénotypes sont encore à caractériser. En effet, ce système pourrait aussi intervenir dans le contournement de la fermeture des stomates comme c'est le cas pour *X. campestris* pv. *campestris* (Gudesblat *et al.*, 2009). Le quorum sensing est aussi connu pour réguler de nombreux processus biologiques, y compris le chimiotactisme, la biosynthèse du flagelle et sa mobilité, la production et la sécrétion d'EPS et de LPS, ainsi que d'autres facteurs de pathogénie (Dow, 2008 ; Guo *et al.*, 2012 ; He et Zhang, 2008). Il est donc légitime de penser que ce système régule la biosynthèse d'autres molécules qui sont nécessaires à *X. albilineans* pour réaliser son cycle infectieux, et qui restent à identifier.

Il apparait cependant que, contrairement à ce qui a été décrit chez d'autres bactéries phytopathogènes, la régulation DSF-dépendante ne joue pas un rôle central dans la régulation

du pouvoir pathogène de *X. albilineans*, et notamment les traits indispensables pour le développement épiphyte de cet agent pathogène. Chez d'autres bactéries phytopathogènes, les gènes du quorum sensing jouent un rôle névralgique puisqu'ils permettent de coordonner et de réguler l'expression de plusieurs traits indispensables à l'expression du pouvoir pathogène. Chez *X. albilineans*, le DSF n'a pas d'importance majeure dans la survie épiphyte, l'apparition des symptômes de l'échaudure des feuilles et la multiplication de la bactérie *in planta*. Le système de régulation RpfG/RpfC n'est pas impliqué dans la survie épiphyte de la bactérie, mais il régule négativement la colonisation de la tige par *X. albilineans* (Rott *et al.*, 2013). Etant donné qu'un système DSF/RpfGC intact est cependant nécessaire pour une colonisation optimale de la phyllosphère et pour une régulation de la colonisation de la tige, on peut émettre l'hypothèse que les différents éléments du système *rpf* peuvent être complétés individuellement par d'autres gènes de la bactérie ou qu'un autre système de quorum sensing peut prendre le relai du système DSF-dépendant en cas de défaillance de ce dernier. En effet, un autre système de quorum sensing a été décrit chez *X. albilineans*. Il s'agit du DF, un facteur diffusible qui régule la production des xanthomonadines (pigments de couleur jaune) et des EPS, des facteurs indispensables pour la vie épiphyte et la pathogénie de cette bactérie (Poplawsky et Chun, 1998). Ce système a déjà été muté chez *X. albilineans* mais sans conséquence évidente pour la pathogénie de *X. albilineans in planta* (Rott *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant d'inactiver les deux systèmes dans un seul mutant pour analyser l'éventuelle synergie ou complémentarité des deux systèmes. De plus, *X. albilineans* possède d'autres systèmes de régulation à deux composantes dont le rôle n'a pas encore été étudié (Pieretti *et al.*, 2012).

Le rôle du DSF chez *X. albilineans* reste énigmatique à ce jour. La bactérie peut être transmise par voie aérienne (Daugrois *et al.*, 2003 et 2012), mais aucun insecte vecteur n'a encore été identifié. Toutefois, *X. albilineans* possède un système de sécrétion qu'on trouve habituellement chez les bactéries associées aux mammifères ou aux insectes, le SST3 SPI-1 (Marguerettaz *et al.*, 2011). Le DSF pourrait donc avoir un rôle dans l'interaction de *X. albilineans* avec un insecte vecteur, comme c'est le cas chez *Xylella fastidiosa* (Newman *et al.*, 2004) ou avec un animal comme le rat qui peut proliférer dans les champs de canne à sucre et qui a été rapporté comme vecteur de la maladie (Ricaud et Ryan, 1989).

I.3/ Les petites molécules produites par les mégaenzymes NRPS (« Non Ribosomal Peptide Synthetase ») : indispensables pour la survie épiphyte de *X. albilineans*

Les métabolites secondaires (dont l'albicidine) produits par les mégaenzymes NRPS de *X. albilineans* ne sont pas essentiels pour la survie épiphyte de la bactérie en surface de feuilles, au moins en l'absence d'autres microorganismes compétiteurs. En effet, une souche de *X. albilineans* mutée au niveau du gène *albXXI* (qui code une enzyme impliquée dans l'activation post-transcriptionnelle des NRPSs, notamment la synthèse de l'albicidine) a une capacité de survie épiphyte similaire à celle de la souche sauvage. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la toxine albicidine, qui est aussi un antibiotique, confère à *X. albilineans* un avantage compétitif lors de la colonisation de la phyllosphère dans les conditions naturelles de culture de la canne à sucre. Il serait donc intéressant de tester la capacité de cette souche à coloniser la canopée de la canne dans des conditions naturelles ou bien suite à la réalisation d'expérimentations de co-inoculations en présence de la souche sauvage ou d'autres bactéries par exemple. Chez les pathovars de *P. syringae*, les petites molécules produites par les mégaenzymes NRPS comme la syringomycine, la syringofactine et la coronatine jouent un rôle non négligeable dans l'adaptation de ces bactéries à la phyllosphère et permettent aussi la transition d'un mode de vie épiphyte à un mode de vie parasite (Lindow et Brandl, 2003 ; Melotto *et al.*, 2006). Ces phytotoxines (i) permettent d'augmenter la perméabilité de la cuticule, les nutriments sont ainsi plus disponibles pour les bactéries, (ii) jouent le rôle de surfactant et contribuent à la mobilité de type « swarming » des bactéries et (iii) permettent aux bactéries de contourner les mécanismes de défense mis en place par la plante au niveau des stomates et des blessures (Hutchison *et al.*, 1995 ; Melotto *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2012). Les métabolites secondaires produits par les mégaenzymes NRPS de *X. albilineans* ne semblent pas jouer le rôle de surfactant puisqu'aucune différence n'a été observée, lors de bioessais réalisés *in vitro*, entre la souche sauvage et la souche mutée au niveau du gène *albXXI* (Royer *et al.*, résultats non publiés).

I.4/ La souche XaS3 (ou GPE39) : une espèce de *Xanthomonas* apparentée à *X. albilineans* mais non pathogène et capable de survivre en surface des feuilles de la canne à sucre (cf. Annexe 4)

Nous avons montré que la souche XaS3, une espèce bactérienne phylogénétiquement proche de *X. albilineans* mais qui n'est pas pathogène sur canne à sucre, est capable de

survivre en surface des feuilles de cette plante (cf. Annexe 4). Cette survie est similaire aux souches sauvages XaFL07-1 et GPE PC73 de *X. albilineans* qui sont associées à la transmission aérienne de l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. Ce résultat était prévisible étant donné que la souche XaS3 a été isolée à partir de gouttelettes de rosée collectées en surface des feuilles de canne à sucre au champ (Daugrois *et al.*, 2003). Nous avons également testé la pathogénie de cette souche par des inoculations en serre, et les résultats obtenus permettent de confirmer ceux décrits par Daugrois *et al.* (2003). La souche XaS3 est donc une bactérie saprophyte de la canne à sucre car elle est incapable de coloniser les tissus de cette plante et de provoquer les symptômes d'échaudure des feuilles ou d'une autre maladie. Daugrois *et al.* (2003) ont également montré que la souche XaS3 est éliminée progressivement de la canopée de la canne à sucre suite à l'apparition et l'augmentation des populations bactériennes d'une souche sauvage de *X. albilineans* transmise par voie aérienne (et appartenant au groupe génétique PFGE-B).

La souche XaS3 possède les gènes codant les polysaccharides de surface et la protéine XaOmpA qui sont nécessaires pour la survie épiphyte de *X. albilineans*. En revanche, XaS3 est dépourvue des gènes NRPS responsables de la biosynthèse de l'albicidine. De plus, les métabolites secondaires produits par les mégaenzymes NRPS de cette souche sont différents de ceux produits par la souche sauvage GPE PC73 car ils n'ont pas la même séquence peptidique et pas le même nombre d'acides aminés (Royer *et al.*, accepté). Ces métabolites secondaires, voire l'antibiotique albicidine, pourraient intervenir dans les mécanismes permettant à *X. albilineans* d'éliminer la souche XaS3. Toutefois, la souche XaS3 possède une ADN gyrase très proche de celle de *X. albilineans* lui conférant la résistance à l'albicidine (Marguerettaz, 2010). Afin de vérifier le rôle des molécules synthétisées par les NRPS dans la compétition entre ces espèces bactériennes, on pourrait envisager le transfert des mégaenzymes NRPS d'une souche sauvage de *X. albilineans* dans le génome de la souche XaS3.

Par ailleurs, le comportement épiphyte similaire entre *X. albilineans* et cette espèce de *Xanthomonas* non pathogène de la canne à sucre constitue une base intéressante pour identifier des gènes nécessaires à la survie au niveau de la phyllosphère. La première approche est de s'interroger sur le support génétique commun entre la souche XaS3 et les souches sauvages de *X. albilineans* et, par voie de conséquence, d'identifier les différences génétiques entre elles. Ainsi, une analyse de génomique comparative entre ces deux espèces est en cours au sein de l'équipe 3 de l'UMR BGPI, et les résultats de survie épiphyte que nous

avons obtenus pour cette souche seront valorisés par cette analyse comparative (Pieretti *et al.*, en cours de préparation). On peut dès à présent déjà préciser que le pourcentage d'identité en acide aminés entre la souche XaS3 et la souche GPE PC73 varie de 96% (pour les gènes de ménage) à 91% (pour les autres gènes). Comme *X. albilineans*, la souche XaS3 est dépourvue du SST3 Hrp et des gènes *gum*. En revanche, contrairement à *X. albilineans*, elle ne possède pas les clusters de gènes codant l'albicidine et le SST3 SPI-1. Ces deux facteurs représenteraient donc des éléments essentiels du pouvoir pathogène de *X. albilineans*. Le rôle de l'albicidine dans la pathogénie a été déjà démontré. Cette toxine est associée à l'apparition de symptômes foliaires de l'échaudure des feuilles, mais n'est pas indispensable à la colonisation de la plante hôte (Birch, 2001 ; Rott *et al.*, 2011). Cependant, le rôle du SST3 SPI-1 dans la pathogénie de *X. albilineans* reste à élucider car des mutants de ce système de sécrétion ne sont pas affectés dans leur capacité à envahir la canne à sucre et à provoquer des symptômes (Marguerettaz *et al.*, 2011). L'incapacité de la souche XaS3 à envahir la canne à sucre repose donc sur l'absence d'autres gènes encore non identifiés.

II/ REDÉFINITION DE LA LOCALISATION DE *XANTHOMNAS ALBILINEANS* DANS LES TISSUS DE LA CANNE À SUCRE

Dans le but de préciser la localisation exacte de *X. albilineans* dans les tissus de la canne à sucre, nous avons utilisé trois techniques différentes à savoir la microscopie confocale, l'immunocytochimie et la microscopie électronique à transmission (MET). Les observations que nous avons réalisées au niveau de la feuille et de la tige nous ont permis d'affirmer que *X. albilineans* n'est pas une bactérie limitée au xylème de la canne à sucre comme cela a été rapporté dans la littérature. Bien au contraire, cette bactérie est capable de s'échapper du xylème et de pénétrer dans d'autres tissus dès les premiers stades de l'infection. En effet, dans la feuille, *X. albilineans* est présente non seulement dans le xylème, mais aussi dans le phloème, les cellules du parenchyme vasculaire et non vasculaire, ainsi que dans les cellules de l'épiderme. Dans la tige, la bactérie a été observée dans les cellules du parenchyme vasculaire et dans le phloème. D'une manière inattendue, la bactérie a aussi été vue dans les cellules du parenchyme non vasculaire de la tige (appelées aussi cellules de stockage) et dans les espaces intercellulaires de ces cellules. A notre connaissance, un tel phénomène n'avait

pas encore été décrit auparavant chez les bactéries phytopathogènes supposées être vasculaires.

De plus, les résultats que nous avons obtenus vont à l'encontre de nos connaissances sur l'habitat des bactéries phytopathogènes dans les tissus de leur plante hôte. En effet, contrairement aux bactéries pathogènes des mammifères qui peuvent être intracellulaires, les bactéries pathogènes des plantes sont extracellulaires : elles se multiplient localement dans les espaces intercellulaires du mésophylle foliaire (apoplaste) ou/et dans les vaisseaux du xylème (Kukel et Chen, 2006). Seuls les phytoplasmes (bactéries phytopathogènes dépourvues de paroi cellulaire) ainsi que d'autres protéobactéries sont intracellulaires puisqu'ils vivent dans les tubes criblés du phloème. Néanmoins, ces bactéries sont véhiculées et directement déversées dans ces cellules par leurs insectes vecteurs et, contrairement à *X. albilineans*, leur multiplication est exclusivement limitée au phloème (Bové et Garnier, 2002 ; Purcell et Hopkins, 1996). La présence de *X. albilineans* à l'intérieur de cellules des parenchymes vasculaire et non vasculaire est donc inédite et brise un dogme important en bactériologie végétale.

Par ailleurs, les bactéries phytopathogènes ayant un génome réduit comme *Xylella fastidiosa*, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (agent causal du rabougrissement des repousses) et *Ralstonia syzygii* (agent causal de la maladie de Sumatra du giroflier) sont strictement adaptées à un tissu spécifique qu'est le xylème de leur plante hôte, d'où leur appellation 'fastidious xylem-limited bacteria' (Jackson *et al.*, 2011 ; Lindeberg, 2012). Ces bactéries, notamment *Xylella fastidiosa* et *L. xyli* subsp. *xyli* sont aussi dépourvues du système de sécrétion de type III (SST3) Hrp (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004 ; Simpson *et al.*, 2000). *R. syzygii* possède quant à elle le SST3 Hrp, mais cette espèce bactérienne a perdu un grand nombre d'effecteurs sécrétés par ce système de sécrétion (Remenant *et al.*, 2011). Selon Simpson *et al.* (2000) et Remenant *et al.* (2011), la perte du SST3 Hrp chez *Xylella fastidiosa* et celle des effecteurs chez *R. syzygii* sont des événements évolutifs critiques qui traduisent l'inutilité de ces gènes dans le style de vie de ces espèces bactériennes étant donné que ces dernières sont directement introduites dans les vaisseaux du xylème par leurs insectes vecteurs. Tout comme ces bactéries, *X. albilineans* a subi une érosion importante de son génome au cours de sa spéciation et elle est aussi dépourvue du SST3 Hrp (Pieretti *et al.*, 2009). Même si elle partage avec les 'fastidious xylem-limited bacteria' des critères qui sont en relation directe avec la restriction des bactéries à un tissu particulier, *X. albilineans* sort encore une fois du lot puisqu'elle est capable de pénétrer dans plusieurs types cellulaires.

Quelle est la stratégie utilisée par *X. albilineans* pour coloniser les différents types cellulaires ?

Pendant le processus infectieux, les bactéries phytopathogènes déploient des stratégies différentes et sophistiquées pour induire la maladie, et celles-ci dépendent essentiellement de leurs caractéristiques génomiques et de leurs modes de vie. Les bactéries phytopathogènes responsables de pourritures molles sont nommées les ‘brute force pathogens’ (agents pathogènes de force brute). En effet, dès le début de l’infection, celles-ci utilisent un large arsenal enzymatique, notamment des pectinases, pour macérer les parois du parenchyme (Jafra *et al.*, 1999 ; Toth *et al.*, 2003). La macération des tissus est accompagnée d’une multiplication massive des bactéries qui ne peuvent plus être localisées dans les espaces intercellulaires puisque le tissu végétal est complètement détruit. Contrairement à ces bactéries, *X. albilineans* n’induit pas une macération ou une pourriture des tissus, et ne provoque pas une dégradation accrue de ces derniers dès le début de l’infection. En effet, les observations de microscopie confocale de sections de tiges réalisées deux mois après inoculation n’ont pas révélé une modification de l’intégrité ni de la forme des cellules du parenchyme non vasculaire infectées (Article 2, Figure 5). Nous avons essayé de vérifier ces observations par MET mais pour l’instant sans succès car nous n’avons pas réussi à retrouver des cellules du parenchyme non vasculaire colonisées par la bactérie. Ce résultat est certainement dû à une limite de la microscopie électronique qui ne permet d’examiner qu’une petite et fine proportion d’un échantillon donné et qui, contrairement à la microscopie confocale, ne permet pas d’avoir une vue d’ensemble de la localisation des bactéries.

D’autres bactéries, comme les pathovars de *P. syringae* et les *Xanthomonas*, sont appelées les ‘stealth pathogens’ (agents pathogènes furtifs). La stratégie utilisée par ces dernières dépend essentiellement du SST3 Hrp, un système conservé chez la plupart des bactéries à Gram négatif. Ce système leur permet d’injecter directement à l’intérieur de la cellule eucaryote une multitude d’effecteurs dont le rôle est de moduler finement les fonctions biologiques de la cellule végétale, et notamment les défenses immunitaires de la plante hôte (Collmer *et al.*, 2009 ; Davidsson *et al.*, 2013 ; Rico *et al.*, 2009).

Il est évident que *X. albilineans* ne peut être classée ni dans le groupe des ‘stealth pathogens’, ni dans celui des ‘brute force pathogens’ puisqu’elle ne possède pas de SST3 Hrp, ni un large arsenal d’enzymes de dégradation de la paroi végétale. De plus, contrairement à ces bactéries qui ont acquis un arsenal très complexe pour induire la maladie, *X. albilineans*

est décrite comme une bactérie ayant une artillerie réduite au vu des facteurs de pathogénie qu'elle a perdus ou qu'elle n'a même pas acquis au cours de sa spéciation (Pieretti *et al.*, 2012). On peut donc légitimement s'interroger sur les mécanismes qui permettent à cette bactérie de coloniser plusieurs types cellulaires et en particulier les cellules du parenchyme non vasculaire.

Pour répondre à cette question, nous avons essayé de caractériser le rôle de divers gènes candidats de pathogénie dans la colonisation des tissus foliaires. Les gènes étudiés sont impliqués dans la production de polysaccharides de surface (PS) (4 souches), d'une protéine de la membrane externe (XaOmpA) (une souche), de métabolites secondaires (albicidine et autres molécules produites par les mégaenzymes NRPS) (une souche), du facteur diffusible DSF (4 souches) et du SST3 SPI-1 (2 souches). Aucun de ces gènes, et notamment le SST3 SPI-1, n'est apparu impliqué dans l'envahissement des différents tissus foliaires de la canne à sucre. Toutefois, les mutants de PS ainsi que le mutant au niveau de la protéine XaOmpA étaient sévèrement affectés dans leur capacité à coloniser les tissus foliaire de la canne à sucre. Ils restent en effet localisés au niveau du point d'inoculation et ne colonisent qu'un nombre très faible de faisceaux vasculaires et de cellules non vasculaires par comparaison avec les souches sauvages de *X. albilineans*. Ces mutants sont donc incapables de se multiplier *in planta* et de progresser dans les tissus de la canne, ce qui justifie la perte de pathogénie de ces derniers (Fleites *et al.*, 2013 ; Rott *et al.*, 2011).

Le SST3 SPI-1 est un système que l'on trouve habituellement chez les bactéries associées aux mammifères et aux insectes, et il était un bon candidat pour identifier un mécanisme sous-jacent à la colonisation des cellules du parenchyme non vasculaire. En effet, ce système de sécrétion est nécessaire pour la colonisation et la prolifération intracellulaire des bactéries dans les cellules d'un hôte mammifère (Prost *et al.*, 2007). A titre d'exemple, les salmonelles induisent leur propre phagocytose par les cellules de l'hôte suite à l'injection des effecteurs *via* le SST3 SPI-1. Ces effecteurs vont induire un réarrangement de l'actine et un remaniement du cytosquelette de la cellule, provoquant ainsi l'internalisation (l'ingestion) de la bactérie par macropinocytose. Les SST3 SPI-1 et SPI-2 sont aussi importants pour la survie et la multiplication intracellulaire de ces bactéries (Prost *et al.*, 2007). Les deux souches de *X. albilineans* mutées au niveau du SST3 SPI-1 (Marguerettaz *et al.*, 2011), et étudiées au cours de cette thèse, ne semblent pas être impliquées dans la colonisation des différents tissus foliaires. Cependant, nous ne pouvons pas exclure un rôle du SST3 SPI-1 dans la pénétration de la bactérie à l'intérieur des cellules de la canne à sucre car les deux souches utilisées sont

des mutants d'insertion (au niveau de la seringue) et nous n'avons aucune certitude quant à la sécrétion ou non d'effecteurs. La construction et la caractérisation de mutants de délétion au niveau de l'ATPase ou du translocon du SST3 SPI-1 devrait permettre de lever d'éventuels doutes quant à l'implication ou non de ce système de sécrétion dans la colonisation des cellules.

Comme observé par microscopie électronique, *X. albilineans* est capable de sortir des cellules du xylème et des cellules du parenchyme vasculaire par digestion de la paroi. L'agent causal de l'échaudure des feuilles possède cinq enzymes de dégradation de la paroi cellulaire qui lui sont particulières et qui pourraient être impliquées dans la progression des bactéries *in planta*, notamment dans la sortie du xylème (Pieretti *et al.*, 2012). Comme c'est le cas pour *Xylella fastidiosa*, *X. albilineans* pourrait utiliser ces enzymes pour dégrader par exemple la paroi des ponctuations (zones dépourvues de paroi secondaire et appelées « pits » en anglais) qui assurent la communication latérale entre les vaisseaux du xylème et les cellules du parenchyme vasculaire. Ces enzymes pourraient permettre de créer des petites ouvertures au début de l'infection assurant ainsi le passage des bactéries du xylème vers d'autres cellules. En revanche, l'implication de ces mêmes enzymes pour pénétrer dans les cellules du parenchyme non vasculaire est moins évidente. Nous avons réalisé des extractions de protoplastes à partir de cannes infectées afin de vérifier si la pénétration de *X. albilineans* dans les cellules du parenchyme non vasculaire impliquait une dégradation des cellules. Cette expérimentation ne fut pas concluante car le nombre de protoplastes infectés était faible (6 à 10%, vérifié par cytométrie de flux), et les observations de microscopie confocale ne nous ont pas permis de détecter sans ambiguïté les protoplastes contenant les bactéries marquées à la gfp. Il serait intéressant de poursuivre dans cette voie en cultivant des bactéries fluorescentes avec des protoplastes sains et ainsi voir si *X. albilineans* est capable de pénétrer dans ces cellules sans les dégrader comme cela a été montré pour *Salmonella typhimurium*, une bactérie pathogène de l'homme qui peut aussi proliférer à l'intérieur des cellules d'*Arabidopsis* (Schikora *et al.*, 2008). Le mécanisme par lequel cette bactérie colonise les cellules d'*Arabidopsis* n'a pas encore été identifié (Schikora *et al.*, 2008).

Une dégradation importante des parois du xylème et des cellules du parenchyme vasculaire a été observée par microscopie électronique lors des stades avancés de l'infection (5 mois après inoculation). Ce résultat renforce l'idée que *X. albilineans* pourrait utiliser des enzymes hydrolytiques, notamment dans les stades ultimes de la maladie, afin de se libérer du xylème et d'envahir d'autres tissus plus riches en nutriments. Afin de vérifier cette hypothèse,

la construction de mutants au niveau de ces enzymes est en cours et l'analyse de leur comportement *in planta* est envisagée. Il serait également intéressant de tester la capacité de la souche sauvage à produire ces enzymes (cellulases, pectinases...) *in vitro*.

Afin de pénétrer dans les cellules, *X. albilineans* pourrait cependant aussi utiliser d'autres mécanismes. Les *Bradyrhizobium* pénètrent dans la cellule végétale par invagination de la paroi (Bonaldi *et al.*, 2011). Même si nous n'avons pas observé ce phénomène au cours de nos travaux, on ne peut l'exclure chez *X. albilineans*, surtout si une ou quelques bactéries seulement rentrent initialement dans la cellule végétale. L'absence de SST3 Hrp pourrait également constituer un avantage en permettant à *X. albilineans* d'échapper au système immunitaire de la canne à sucre comme cela a déjà été suggéré pour la protéine FlhD (Pieretti *et al.*, 2012). Les bactéries se déplaceraient ainsi plus facilement au niveau des différents tissus de la plante, et notamment à l'intérieur des cellules. Chez les bactéries phytopathogènes, le SST3 Hrp interfère avec la colonisation intracellulaire. La colonisation intracellulaire des cellules végétales par une souche de *R. solanacearum* transformée en une bactérie symbiotique (contenant un plasmide permettant la fixation de l'azote et la nodulation) requiert des mutations adaptatives au niveau du SST3 Hrp ou au niveau du régulateur HrpG (Guan *et al.*, 2013 ; Marchetti *et al.*, 2010). La perte ou la non acquisition du SST3 Hrp chez *X. albilineans* au cours de sa spéciation aurait à ce moment là été un avantage sélectif très important.

Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de colonisation des tissus végétaux qui reste encore à décrypter. Ce décryptage pourrait être poursuivi par génomique fonctionnelle en utilisant une banque de mutants Tn5 par exemple (Rott *et al.*, 2011) ou en réalisant des mutants de délétion pour des gènes candidats comme cela a été réalisé pour étudier le rôle du cluster *rpf* dans la pathogénie de *X. albilineans* (Rott *et al.*, 2013). Par ailleurs, la caractérisation de souches sauvages de *X. albilineans* présentant de grandes différences en termes d'agressivité pourrait aussi s'avérer utile. Une souche extrêmement agressive de cet agent pathogène (GAB266) a récemment été isolée au Gabon (Mensi *et al.*, 2013). En effet, contrairement aux souches de *X. albilineans* préalablement étudiées dans l'équipe, celle-ci est capable de provoquer la mort de plusieurs variétés de canne à sucre après inoculation des plantes en serre. Une comparaison du comportement *in planta* de cette souche avec d'autres souches sauvages pourrait conduire à une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans*, et notamment sa progression *in planta*. Des essais préliminaires réalisés avec la souche GAB266

n'ont pas été fructueux car le plasmide contenant la protéine gfp s'est avéré instable dans cette souche bactérienne, démontrant si besoin est que cette souche a des propriétés génomiques différentes des autres souches utilisées au cours de cette thèse. La comparaison du génome de la souche GAB266 avec 15 autres souches de *X. albilineans* représentant la diversité connue chez cette espèce bactérienne est en cours dans l'équipe 3 de l'UMR BGPI.

Finalement, si *X. albilineans* est la première espèce du genre *Xanthomonas* pour laquelle la présence à l'intérieur des cellules végétales a été mise en évidence, elle n'est peut-être pas la seule. Il existe d'autres espèces du genre *Xanthomonas* qui ont un génome réduit comme c'est le cas pour *X. fragariae* (Vandroemme *et al.*, 2012) et des espèces de *Xanthomonas* dépourvues du SST3 Hrp comme celles récemment isolées à partir du bananier (Studholme *et al.*, 2011). Des études plus approfondies du pouvoir pathogène de ces espèces pourraient peut-être aussi conduire à la découverte de nouveaux mécanismes de colonisation ou confirmer l'existence de celui mis en évidence chez *X. albilineans*.

Conclusion générale

Chapitre V : Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été articulés autour de deux axes principaux : (i) le premier avait pour objectif d'étudier la survie épiphyte de *X. albilineans* et d'identifier les déterminants moléculaires impliqués dans cette étape du cycle de la maladie, et (ii) le deuxième visait à préciser la localisation de *X. albilineans in planta* et à étudier le rôle de certains gènes candidats de pathogénie dans la colonisation des tissus de la canne à sucre.

Dans la première partie de cette thèse, et grâce à un dispositif miniaturisé que nous avons mis au point, nous avons montré que parmi les facteurs étudiés, deux s'avèrent indispensables pour la survie épiphyte de *X. albilineans* : il s'agit des polysaccharides de surface (PS) et d'une protéine de la membrane externe (XaOmpA1). Les souches mutées au niveau de ces molécules perdent complètement leur capacité de survie en surface des feuilles de la canne à sucre. Contrairement aux polysaccharides de surface, la protéine XaOmpA1 semble avoir un rôle dans la fitness de la bactérie et non pas dans la pathogénie *sensus stricto*. Etant donné que ces souches étaient sévèrement affectées dans leur capacité de survie épiphyte, nous avons émis l'hypothèse qu'elles sont également affectées dans leur capacité à produire des biofilms, des structures reconnues comme étant impliquées dans l'installation et le maintien des bactéries en surface des feuilles. Afin de vérifier cette hypothèse, la capacité de mutants de PS et de la protéine XaOmpA1 à former des biofilms a été testée *in vitro*. Comme on pouvait s'y attendre, le mutant XaOmpA1 produit moins de biofilms que la souche sauvage. En revanche, et de manière inattendue, les mutants de PS forment des biofilms plus développés que la souche sauvage *in vitro*. Ce résultat est surprenant puisqu'il ne permet pas d'expliquer le phénotype de ces mutants observé en surface des feuilles. Une nouvelle voie de recherche consisterait donc à tester la capacité de la souche sauvage de *X. albilineans* et des mutants de PS à former des biofilms en surface des feuilles. De part leur rôle dans l'installation au niveau de la phyllosphère de la canne à sucre (démontré au cours de cette thèse), et leur implication dans la multiplication de la bactérie *in planta* et la production des symptômes de la maladie (Rott *et al.*, 2011), les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides constituent de nouveaux déterminants moléculaires du pouvoir pathogène de *X. albilineans*. En conséquence, ces polysaccharides de surface constituent des cibles potentielles pour cribler des composés antimicrobiens permettant de diversifier la lutte contre l'échaudure des feuilles de la canne à sucre.

Par ailleurs, nous avons montré que la molécule signal diffusible DSF n'est pas essentielle pour la survie épiphyte de *X. albilineans*. Cependant, la colonisation optimale de la phyllosphère de la canne à sucre par *X. albilineans* fait intervenir un système DSF/RpfGC intact. Ce résultat permet de montrer que, contrairement aux autres *Xanthomonas*, la régulation DSF dépendante ne joue pas un rôle central dans la régulation des traits indispensables pour la survie épiphyte de *X. albilineans*. De même, Rott *et al.* (2013) ont montré que ce système de régulation n'est pas requis par *X. albilineans* pour la colonisation de sa plante hôte. Afin de décrypter le rôle de la régulation DSF dépendante dans la pathogénie de *X. albilineans*, il serait intéressant de déterminer les gènes qui sont régulés par ce système de régulation chez l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre.

Les métabolites secondaires produits par les mégaenzymes NRPS ne sont quant à eux pas impliqués dans la survie épiphyte de *X. albilineans*, du moins en l'absence de compétition avec d'autres microorganismes. Le rôle de ces mégaenzymes devrait donc aussi être étudié en serre en conditions non axéniques, en présence de la souche sauvage (co-inoculations) ou d'autres bactéries adaptées à la canne à sucre.

L'espèce de *Xanthomonas* non pathogène appelée XaS3, et qui est phylogénétiquement proche de *X. albilineans*, est capable de survivre en surface des feuilles de la canne à sucre de manière similaire aux souches sauvages associées à la dissémination aérienne de *X. albilineans*. Le comportement épiphyte similaire entre *X. albilineans* et la souche XaS3 constitue une base intéressante pour identifier d'autres déterminants moléculaires nécessaires à la survie au niveau de la phyllosphère de la canne à sucre. D'autres traits comme le chimiotactisme, la mobilité et l'adhésion peuvent être importants pour la survie épiphyte de *X. albilineans*. Une analyse du transcriptome des cellules bactériennes épiphytes pourrait permettre d'identifier d'autres gènes nécessaires à la survie épiphyte de *X. albilineans*.

Dans la deuxième partie de cette thèse, en se basant sur diverses techniques de microscopie, nous avons montré que *X. albilineans* n'est pas une bactérie limitée au xylème de la canne à sucre comme cela a été rapporté dans la littérature. Bien au contraire, cette bactérie est capable de s'échapper du xylème et de pénétrer dans d'autres types cellulaires dès les premiers stades de l'infection. En effet, dans la feuille, *X. albilineans* est présente non seulement dans le xylème, mais aussi dans le phloème, les cellules du parenchyme vasculaire et non vasculaire, ainsi que dans les cellules de l'épiderme. Dans la tige, la bactérie a été observée dans les cellules du parenchyme vasculaire et dans le phloème. D'une manière

surprenante, la bactérie a aussi été vue dans les cellules du parenchyme non vasculaire de la tige (appelées aussi cellules de stockage) et dans les espaces intercellulaires de ces cellules. Ces résultats brisent un dogme en bactériologie végétale puisque, à notre connaissance, un tel phénomène n'avait pas encore été décrit auparavant chez les bactéries phytopathogènes. Toutefois, les mécanismes déployés par *X. albilineans* pour pénétrer dans les différents types cellulaires restent à élucider. En effet, la caractérisation de la localisation *in planta* de plusieurs souches mutées au niveau des gènes candidats de pathogénie (notamment le SST3 SPI-1) ne nous a pas permis d'identifier un rôle de ces derniers dans l'envahissement des différents tissus foliaires de la canne à sucre.

Dans les stades avancés de l'infection, une dégradation importante des parois du xylème et des cellules du parenchyme vasculaire a été observée par microscopie électronique. *X. albilineans* possède cinq enzymes de dégradation de la paroi cellulaire qui lui sont particulières et qui pourraient être impliquées dans la progression de la bactérie *in planta*, notamment dans la sortie du xylème. Le rôle de ces enzymes dans la colonisation des différents types cellulaires dès le début de l'infection serait aussi à démontrer. Afin de vérifier cette hypothèse, la construction de mutants au niveau de ces enzymes est en cours et l'analyse de leur comportement *in planta* est envisagée. L'agent causal de l'échaudure des feuilles pourrait aussi utiliser d'autres stratégies pour pénétrer dans différents types cellulaires, notamment au cours des premiers stades de l'infection.

Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de colonisation des tissus végétaux par une bactérie pathogène, et cette découverte constitue le début du décryptage de nouveaux mécanismes d'interactions plantes-bactéries en pathologie végétale.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB, 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8):601–611.
- Abramovitch RB, Kim Y-J, Chen S, Dickman MB, Martin G, 2003. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J*, 22:60–69.
- Abramovitch RB, Martin GB, 2004. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 356-364.
- Akhavan A, Bahar M, Askarian H, Lak MR, Nazemi A, Zamani Z, 2013. Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. *SpringerPlus*, 2:41.
- Aki T, Shigyo M, Nakano R, Yoneyama T, Yanagisawa S, 2008. Nano scale proteomics revealed the presence of regulatory proteins including three FT-like proteins in phloem and xylem and sap from rice. *Plant Cell Physiol*, 49:767–790.
- Alavi SM, Sanjari S, Durand F, Brin C, Manceau C, Poussier S, 2008. Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. *Appl Environ Microbiol*, 74(10):3295-3301.
- Alfano JR, Collmer A, 1996. Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *The Plant cell*, 8 (10):1683–1698.
- Alves E, Marucci CR, Lopes JRS, and Leite B, 2004. Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. *J Phytopathol*, 152(5):291–297.
- Antúnez-Lamas M, Cabrera E, López-Solanilla E, Solano R, Gonzalez-Melendi P, et al. 2009. Bacterial chemoattraction towards jasmonate plays a role in the entry of *Dickeya dadantii* through wounded tissues. *Mol Microbiol*, 74:662–671.
- Ashby SF, 1929. The bacterium which causes gumming disease of sugar canes with notes on two other bacterial diseases of the same host. *Trop Agric*, 6 :135–138.
- Aslam SN, Newman M, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, et al. 2008. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr Biol*, 18: 1078–1083.
- Autrey LJC, Saumtally S, Dookun A, Sullivan S, Dhayan S, 1995. Aerial transmission of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists*, 21: 508–526.
- Bai F, Branch RW, Nicolau DV, Pilizota T, Steel BC, Maini PK, Berry R, 2010. Conformational spread as a mechanism for cooperativity in the bacterial flagellar switch. *Science*, 327(5966):685-689.
- Baltrus DA, Nishimura MT, Romanchuk A, Chang JH, Mukhtar MS, et al. 2011. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog*, 7:e1002132.

- Barras F, Van Gijsegem F, Chatterjee AK, 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu Rev Phytopathol*, 32:210-234.
- Basha SM, Mazhar H, Vasanthaiah HKN, 2010. Proteomics approach to identify unique xylem sap proteins in pierce's disease-tolerant *Vitis* species. *Appl Biochem Biotechnol*, 160 (3): 932-944.
- Bassler BL, Losick R, 2006. Bacterially speaking. *Cell*, 125: 237-246.
- Beattie G, 2011. Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. *Annu Rev Phytopathol*, 49:533-555.
- Beattie GA, Lindow SE, 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu Rev Phytopathol*, 33:145-172.
- Beattie GA, Lindow SE, 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 89(5):353-359.
- Bell KS, Sebaihia M, Pritchard L, Holden MT, Hyman LJ, Holeva MC, Thomson NR, Bentley SD, Churcher LJ, Mungall K, et al. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *PNAS*, 101: 11105-11110.
- Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC, 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63:266-292.
- Berti AD, Greve NJ, Christensen QH, Thomas MG, 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *J Bacteriol*, 189:6312-6323.
- Birch RG, 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol Plant Pathol*, 2: 1-11.
- Birch RG, Patil SS, 1985. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 131:1069- 1075.
- Birch RG, Patil SS, 1987a. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Physiol Mol Plant Pathol*, 30: 207-214.
- Birch RG, Patil SS, 1987b. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Physiol Mol Plant Pathol*, 30: 199-206.
- Black LL, Machmud M, 1983. *Xanthomonas* leaf spot of crucifers. In: Fourth International Congress of Plant Pathology, 126 p.
- Blackburn F, 1984. Sugar Cane. Tropical Agriculture. Longman Group, Harlow, UK., 414 p.
- Blanch M, Legaz M-E, Vicente C, 2008a. Xanthan production by *Xanthomonas albilineans* infecting sugarcane stalks. *J Plant Physiol*, 165: 366-374.
- Blanch M, Legaz M-E, Vicente C, 2008b. Purification and properties of an unusual UDP-glucose dehydrogenase, NADPH-dependent, from *Xanthomonas albilineans*. *Microbiol Res*, 163:362-371.
- Boch J, 2009. The art of manipulation: Bacterial type III effectors and their plant targets. in: Plant pathogenic bacteria: Genomics and molecular biology, eds. Robert WJ, School of Biological Sciences, (Whiteknights, Reading UK), pp 241-271.

- Boch J, Bonas U, 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu Rev Phytopathol*, 48:419–436.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, et al. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326:1509–1512.
- Bocsanczy AM, Nissinen RM, Oh CS, Beer SV, 2008. HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol Plant Pathol*, 9: 425–434.
- Bogdanove AJ, Koebnik R, Lu H, Furutani A, Angiuoli SV, Patil PB, Van Sluys M-A, et al. 2011. Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *J bacterial*, 193(19):5450–5464.
- Boher B, Brown M, Nicole M, Kpemoua K, Verdier V, Bonas U, Daniel JF, Geiger JP, Mansfield J, 1996. Histology and cytochemistry of interactions between plants and Xanthomonds. In: Histology, ultrastructure and molecular cytology of plant-microorganism interactions, Eds. Michel N, Gianinazzi-Pearson V, (Kluwer Academic Publishers), pp 193-210.
- Boher B, Kpemoua K, Nicole M, Luisetti J, Geiger JP, 1995. Ultrastructure of interactions between Cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: Cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology*, 85(7):777–788.
- Bonaldi K, Gargani D, Prin Y, Fardoux J, Gully D, Nouwen N, Goormachtig S, Giraud E, 2011. Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic Bradyrhizobium Sp. strain ORS285: the nod-dependent versus the nod-independent symbiotic interaction. *MPMI*, 24(11):1359–71.
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ, 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J*, 382 (3): 769-781.
- Boulanger A, Dejean G, Lautier M, Glories M, Zischek C, Arlat M, Lauber E, 2010. Identification and regulation of the N-acetylglucosamine utilisation pathway of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol*, 192: 1487–1497.
- Boureau T, Routtu J, Roine E, Taira S, Romantschuk M, 2002. Localization of *hrpA*-induced *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* leaves. *Mol Plant Pathol*, 3:451–460.
- Bové J, Garnier M, 2002. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science*, 163(6):1083–1098.
- Bradbury JF, 1984. *Xanthomonas* Dowson. 1939. In: *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, Vol. 1 Krieg NR, Holt JG, eds (Baltimore, Williams & Wilkins), 199-210.
- Bren A, Eisenbach M, 2000. How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. *J Bacteriol*, 182 (24), 6865-6873.
- Brown I, Mansfield J, Irlam I, Conrads Strauch J, Bonas U, 1993. Ultrastructure of interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and pepper, including immunocytochemical localization of extracellular polysaccharides and the AvrBs3 protein. *MPMI*, 6 : 376–386.
- Bruton BD, Mitchell F, Fletcher J, Pair SD, Wayadande A, Melcher U, Brady J, Bextine B, Popham, TW, 2003. *Serratia marcescens*, a phloem-colonizing, squash bug transmitted bacterium: Causal agent of cucurbit yellow vine disease. *Plant Disease*, 87:937-944.

- Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, et al. 2003. The complete sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PNAS*, 100: 10181–10186.
- Buhtz A, Kolasa A, Arlt K, Walz C, Kehr J, 2004. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta*, 219:610–618.
- Bull CT, De Boer SH, Denny TP, Firrao G, Fischer-Le Saux M, Saddler GS, Scortichini M, Stead DE, Takikawa Y, 2010. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007. *J Plant Pathol*, 92:551–592.
- Burch AY, Shimada BK, Mullin SW, Dunlap CA, Bowman MJ, Lindow SE, 2012. *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *J Bacteriol*, 194: 1287–1298.
- Büttner D, Bonas U, 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol*, 9:193–200.
- Büttner D, Bonas U, 2009. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev*, 34:107–133.
- Büttner D, Noël L, Thieme F, Bonas U, 2003. Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. *J Biotechnol*, 106: 203–214.
- Cesbron S, Paulin J-P, Tharaud M, Barny M-A, Brisset M-N, 2006. The alternative σ factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under *hrp*-inducing conditions. *FEMS microbiol lett*, 257(2):221–227.
- Chalupowicz L, Zellermann E-M, Fluegel M, Dror O, Eichenlaub R, Gartemann K-H, Savidor A, et al. 2012. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology*, 102(1):23–31.
- Champoiseau P, Daugrois JH, Girard JC, Royer M, Rott P, 2006a. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology*, 96: 33–45.
- Champoiseau P, Daugrois JH, Pieretti I, Cociancich S, Royer M, Rott P, 2006b. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. *Phytopathology*, 96: 1081–1091.
- Champoiseau P, Rott P, Daugrois JH, 2009. Epiphytic populations of *Xanthomonas albilineans* and subsequent sugarcane stalk infection are linked to rainfall in Guadeloupe. *Plant Disease*, 93:339–346.
- Chang WS, van de Mortel M, Nielsen L, Nino de Guzman G, Li X, Halverson LJ, 2007. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J Bacteriol*, 189: 8290–8299.
- Charkowski A, Blanco C, Condemine G, Expert D, Franza T, Hayes C, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, et al. 2012. The role of secretion systems and small molecules in soft-rot *Enterobacteriaceae* pathogenicity. *Annu Rev Phytopathol*, 50:425–49.
- Chatterjee S, Almeida RPP, Lindow S, 2008a. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu Rev phytopathol*, 46:243–71.

- Chatterjee S, Wistrom C, Lindow SE, 2008b. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *PNAS*, 105, 2670-2675.
- Chen C, Beattie GA, 2008. *Pseudomonas syringae* BetT is a low-affinity choline transporter that is responsible for superior osmoprotection by choline over glycine betaine. *J Bacteriol*, 190: 2717–2725.
- Chen YY, Wu CH, Lin JW, Weng SF, Tseng YH, 2010. Mutation of the gene encoding a major outer-membrane protein in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causes pleiotropic effects, including loss of pathogenicity. *Microbiol*, 156: 2842-2854.
- Choat B, Ball M, Luly J, Holtum J, 2003. Pit membrane porosity and water stress-induced cavitation in four co-existing dry rainforest tree species. *Plant Physiol*, 131 : 41–48.
- Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M, Schulz A, 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci*, 10(11):526–535.
- Clarke CR, Cai R, Studholme DJ, Guttman DS, Vinatzer BA, 2010. *Pseudomonas syringae* strains naturally lacking the classical *P. syringae* *hrp/hrc* locus are common leaf colonizers equipped with an atypical type III secretion system. *MPMI*, 23(2):198–210.
- Clerc F, 1997. Diversité génétique des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre. Maîtrise en bioingénieries. Université Paul Sabatier de Toulouse III, Toulouse, France, 20 p.
- Collmer A, Schneider DJ, Lindeberg M, 2009. Lifestyles of the effector rich: genome-enabled characterization of bacterial plant pathogens. *Plant physiol*, 150(4):1623–1630.
- Comstock JC, 2001. Foliar symptoms of sugarcane leaf scald. *Sugar Journal*, 64:23-32.
- Condemine G, Castillo A, Passeri F, Enard C, 1999. The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *MPMI*, 12:45–52.
- Correa VR, Majerczak DR, Ammar E, Merighi M, Pratt RC, Redinbaugh MG, Coplin DL, Hogenhout SA, 2010. A bacterial pathogen uses distinct type III secretion systems to alternate between host kingdoms. *Phytopathology*, 100:S27.
- Czajkowski R, de Boer WJ, Velvis H, van der Wolf JM, 2010. Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology*, 100(2):134–142.
- D'Hont A, Glaszmann JC, 2001. Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. *Proc Int Soc Sugarcane Technol*, 24:556–559.
- D'Hont A, Ison D, Alix K, Roux C, Glaszmann JC, 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome*, 41(2):221–225.
- D'Hont A, Lu YH, Feldmann P, Glaszmann JC, 1993. Cytoplasmic diversity in sugar cane revealed by heterologous probes. *Sugar Cane*, 1:12-15.
- D'Hont A, Paulet F, Glaszmann JC, 2002. Oligoclonal interspecific origin of “North Indian” and “Chinese” sugarcanes. *Chromosome Res*, 10:253-262.
- da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, et al. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host

specificities. *Nature*, 417:459–463.

Danet J-L, Foissac X, Zreik L, Salar P, Verdin E, Nourrisseau J-G, Garnier M, 2003. “Candidatus *Phlomobacter fragariae*” is the prevalent agent of marginal chlorosis of strawberry in French production fields and is transmitted by the planthopper *Cixius wagneri* (China). *Phytopathology*, 93:644-649.

Danhorn T, Fuqua C, 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Re Microbiol*, 61: 401-422.

Daniels J, Roach BT, 1987. Taxonomy and evolution. In: Sugarcane Improvement Through Breeding. Eds. Heinz DJ, (Elsevier Press, Amsterdam, Holland), pp. 7-84.

Darsonval A, Darrasse A, Durand K, Bureau C, Cesbron S, Jacques M, 2009. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *MPMI*, 22(6):747–57.

Darsonval A, Darrasse A, Meyer D, Demarty M, Durand K, Bureau C, Manceau C, Jacques M, 2008. The Type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible beans. *Appl Environ Microbiol*, 74(9):2669–2678.

Das A, Rangaraj N, Sonti RV, 2009. Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. *MPMI*, 22(1):73–85.

Daudi A, Cheng Z, O’Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM, Bolwell GP, 2012. The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern triggered immunity. *Plant Cell*, 24: 275–287.

Daugrois JH, Boisne-Noc R, Champoiseau P, Rott P. 2012. The revisited infection cycle of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. *Func Plant Sci Biotech*, 6 (Special issue 2), 91–97.

Daugrois JH, Dumont V, Champoiseau P, Costet L, Boisne NR, Rott P, 2003. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. *Eur J Plant Pathol*, 109: 445-458.

Davidsson PR, Kariola T, Niemi O, Palva ET, 2013. Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Front Plant Sci*, 4:191.

Davis M, Rott P, Warmuth C, Chatenet M, Baudin P, 1997. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology*, 87: 316-324.

Déjean G, Blanvillain-Baufumé S, Boulanger A, Darrasse A, de Bernonville TD, Girard A-L, Carrère S, et al. 2013. The xylan utilization system of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* controls epiphytic life and reveals common features with oligotrophic bacteria and animal gut symbionts. *New phytol*, 198 (3):899-915.

Delannoy E, Jalloul A, Assigbetse K, Marmey P, Geiger JP, Lherminier J, Daniel JF, Martinez C, Nicole M, 2003. Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *MPMI*, 16: 1030–1038.

Delmotte N, Knief C, Chaffron S, Innerebner G, Roschitzki B, Schlapbach R, von Mering C, Vorholt JA, 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria.

PNAS, 106(38):16428–33.

Deng WL, Huang HC, 1999. Cellular locations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ proteins, required for harpin secretion via the type III pathway. *J Bacteriol*, 181: 2298-2301.

Deng W-L, Lin Y-C, Lin R-H, Wei C-F, Huang Y-C, Peng H-L, and Huang H-C, 2010. Effects of *galU* mutation on *Pseudomonas syringae*-plant interactions. *MPMI*, 23(9):1184–1196.

Deng Y, Wu J, Tao F, Zhang L-H, 2011. Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Rev*, 111:160–173.

Diggle SP, Crusz SA, Camara M, 2007. Quorum sensing. *Curr Biol*, 17: 907-910.

Dinant S, 2008. Phloem, transport between organs and long-distance signalling. *Cell biol*, 331:334–346.

Doehlemann G, Hemetsberger C, 2013. Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New phytol*, 1001–1016.

Dong Z, McCully ME, Canny MJ, 1997. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. *Ann Bot*, 80: 147–158.

Dow JM, Crossman L, Findlay K, He Y-Q, Feng J-X, Tang J-L, 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *PNAS*, 100 (19):10995–11000.

Dow M, 2008. Diversification of the function of cell-to-cell signaling in regulation of virulence within plant pathogenic xanthomonads. *Science Signal*, 1: 23.

Dow JM, Fouhy Y, Garcia BF, Ryan RP, 2009. Cyclic Di-GMP Signalling and the regulation of virulence in bacterial plant pathogens. in: Plant pathogenic bacteria: Genomics and molecular biology, eds. Robert WJ, School of Biological Sciences, (Whiteknights, Reading UK), pp 273-294.

Dowson WJ, 1943. On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. *Trans Br Mycol Soc*, 26: 1-14.

Dubey RS, 1983. Preparation and partial characterization of *Xanthomonas oryzae* phytotoxin. *Z Allg Mikrobiol*, 23(4):225-233.

Dulla G, Lindow SE, 2008. Quorum size of *Pseudomonas syringae* is small and dictated by water availability on the leaf surface. *PNAS*, 105(8):3082–3087.

Dunger G, Relling VM, Tondo ML, Barreras M, Ielpi L, et al. 2007. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch Microbiol*, 188: 127– 135.

Ensikat HJ, Boese M, Maderb W, Barthlott W, Kocha K, 2006. Crystallinity of plant epicuticular waxes: electron and X-ray diffraction studies. *Chem Phys Lipids*, 144: 45–59.

Feil H, Feil WS, Lindow SE, 2007. Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape. *Phytopathology*, 97(3):318–324.

Feldmann P, Sapotille J, Gredoire P, Rott P, 1994. Micropropagation of sugarcane. In: *In Vitro Culture of Tropical Plants*, eds. CIRAD-GERDAT (Biotrop), Montpellier, France, pp 15-17.

- Felle HH, Hermann A, Hückelhoven R, Kogel KH, 2005. Root-to-shoot signalling: apoplastic alkalization, a general stress response and defence factor in barley (*Hordeum vulgare*). *Protoplasma*, 227: 17–24.
- Fett WF, Osman SF, Dunn MF, 1987. Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads. *Appl Environ Microbiol*, 53:1839–1845.
- Fleites L, Mensi I, Gargani D, Zhang S, Rott P, Gabriel DW, 2013. *Xanthomonas albilineans* OmpA1 appears to be functionally modular and both the OMC and C-like domains are necessary for leaf scald disease of sugarcane. *MPMI*, 26 (10): 1200–1210.
- Fontaniella B, Rodriguez CW, Pinon D, Vicente C, Legaz M-E, 2002. Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. *J Chromatography B*, 770: 275–281.
- Fontaniella B, Vicente C, de Armas R, Legaz M E, 2007. Effect of leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) on polyamine and phenolic acid metabolism of two sugarcane cultivars. *Eur J Plant Pathol*, 119:401–409.
- Freeman BC, Chen CL, Beattie GA, 2010. Identification of the trehalose biosynthetic loci of *Pseudomonas syringae* and their contribution to fitness in the phyllosphere. *Environ Microbiol*, 12: 1486–1497.
- Fry SM, Milholland RD, 1990. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevines resistant, tolerant and susceptible to Pierce's disease. *Phytopathology*, 80: 61–69.
- Gerlach RG, Hensel M, 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol*, 297: 401–415.
- Gilroy EM, Hein I, van der Hoorn R, Boevink PC, Venter E, McLellan H, Kaffarnik F, Hrubikova K, Shaw J, Holeva M et al. 2007. Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. *The Plant Journal*, 52:1–13.
- Goncalvez ER, Rosato YB, 2002. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52:355–361.
- Gostomski PA, Bungay HR, 1996. Effect of glucose and NH₄⁺ levels on poly (beta hydroxybutyrate) production and growth in a continuous culture of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol Prog*, 12(2): 234–239.
- Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, Orellano EG, Ottado J, 2009. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PloS one*, 4(2):e4358.
- Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS, 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol*, 5: 1–15.
- Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL, 2006. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 60: 425–49.
- Grignon C, Sentenac H, 1991. pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 42:103–128.
- Grivet L, Arruda P, 2002. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of a important tropical crop. *Curr Opin Plant Biol*, 5:122–127.

- Groll M, Schellenberg B, Bachmann AS, Archer CR, Huber R, Powell TK, Lindow S, Kaiser M, Dudler R, 2008. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature*, 452: 755-758.
- Grunwald I, Rupprecht I, Schuster G, Kloppstech K, 2003. Identification of guttation fluid proteins: the presence of pathogenesis related proteins in non-infected barley plants. *Physiol Plant*, 119: 192–202.
- Guan SH, Gris C, Cruveiller S, Pouzet C, Tasse L, Leru A, Maillard A, et al. 2013. Experimental evolution of nodule intracellular infection in legume symbionts. *The ISME J*, 7(7):1367–1377.
- Gudesblat EG, Pablo ST, Adrián AV, 2009. *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol*, 149:1017-1027.
- Guinet-Brial I, Girard JC, Roumagnac P, Daugrois JH, Fernandez E, Rott P, 2013. Visacane, an innovative quarantine tool for the exchange of pest and disease-free sugarcane germplasm. *Proceedings International Society of Sugarcane Technologists Congress*, 28:BP13.
- Gunasekera TS, Paul ND, 2007. Ecological impact of solar ultraviolet-B (UVB: 320-290 nm) radiation on *Corynebacterium aquaticum* and *Xanthomonas* sp. colonization on tea phyllosphere in relation to blister blight disease incidence in the field. *Lett Appl Microb*, 44 :513-519.
- Gunasekera TS, Sundin GW, 2006. Role of nucleotide excision repair and photoreactivation in the solar UVB radiation survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *J Appl Microbiol*, 100 : 1073–1083.
- Guo Y, Zhang Y, Li J-L, Wang N, 2012. Diffusible signal factor-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *MPMI*, 25(2):165–179.
- Hashimi SM, Wall MK, Smith AB, Dow MA, Birch RG, 2007. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 181-187.
- Hauben L, Vauterin L, Swings J, Moore ERB, 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *Int J Syst Bacteriol*, 47:328–335.
- He YW, Xu M, Lin K, et al. 2006. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol Microbiol*, 59: 610–622.
- He YW, Zhang L-H, 2008. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev*, 32(5):842–857.
- Hilaire E, Young SA, Willard LH, McGee JD, Sweat T, Chittoor JM, et al. 2001. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *MPMI*, 14 : 1411– 1419.
- Hirano SS, Charkowski AO, Collmer A, Willis DK, Upper CD, 1999. Role of the Hrp type III protein secretion system in growth of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a on host plants in the field. *PNAS*, 96:9851–9856.
- Hirano SS, Upper CD, 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64:624–653.

- Hoad GV, 1995. Transport of hormones in the phloem of higher plants. *Plant Growth Regul*, 16: 173–182.
- Hogan CS, Mole BM, Grant SR, Willis DK, Charkowski AO, 2013. The type III secreted effector DspE is required early in *Solanum tuberosum* leaf infection by *Pectobacterium carotovorum* to cause cell death, and requires W_{x(3-6)}D/E Motifs. *PLoS ONE*, 8(6): e65534.
- Hogenhout S, 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol*, 9:403–423.
- Hood RD, Singh P, Hsu F, Guvener T, Carl MA, et al. 2010. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe*, 7: 25–37.
- Hoson T, 1998. Apoplast as the site of response to environmental signals. *J Plant Res*, 111: 167–177.
- Howard MB, Ekborg N, Taylor, Hutcheson SW, Weiner RM, 2004. Identification and analysis of polyserine linker domains in prokaryotic proteins with emphasis on the marine bacterium *Microbulbifer degradans*. *Protein Sci*, 13(5): 1422–1425.
- Hoy JW, Grisham MP, 1994. Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana. *Plant Dis*, 78: 1083–1087.
- Huang T, Somers EB, and Wong ACL. 2006. Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol*, 188(8):3116–3120.
- Hugouvieux V, Barber CE, Daniels MJ, 1998. Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *MPMI*, 11(6): 537–543.
- Hutchison ML, Johnstone K, 1993. Evidence for the involvement of the surface active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 42:373–384.
- Hutchison ML, Tester MA, Gross DC, 1995. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *MPMI*, 8:610–620.
- Jackson RW, Johnson LJ, Clarke SR, Arnold DL, 2011 Bacterial pathogen evolution: breaking news. *Trends Genet*, 27: 32–40.
- Jacobs J, Babujee L, Meng F, Milling A, Allen C, 2012. The *in planta* transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. *mBio*, 3(4):1–11.
- Jacobs JL, Carroll TL, Sundin GW, 2005. The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microb Ecol*, 49(1):104–113.
- Jacques MA, Josi K, Darrasse A, Samson R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Appl Environ Microbiol*, 71(4):2008–2015.

- Jafrá S, Figura I, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Lojkowska E, 1999. Expression of *Erwinia chrysanthemi* pectinase genes *pell*, *pelL*, and *pelZ* during infection of potato tubers. *MPMI*, 12:845–851.
- James BW, Mauchline WS, Dennis PJ, Keevil CW, Wait R. 1999. Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. *Appl Environ Microbiol*, 65(2):822–7.
- Jarrell KF, McBride MJ, 2008. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol*, 6(6):466–476.
- Jha G, Rajeshwari R, Sonti RV, 2005. Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *MPMI*, 18(9):891–898.
- Jha G, Rajeshwari R, Sonti RV, 2007. Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. *MPMI*, 20: 31–40.
- Kadivar H, Stapleton AE, 2003. Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. *Microb Ecol*, 45(4):353–61.
- Kang Y, Liu H, Genin S, Schell MA, Denny TP, 2002. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol*, 46(2):427–437.
- Karamanoli K, Menkissoglu-spirodi U, Bosabalidis AM, Vokou D, Constantinidou HA, 2005. Bacterial colonization of the phyllosphere of nineteen plant species and antimicrobial activity of their leaf secondary metabolites against leaf associated bacteria. *Chemoecology*, 67:59–67.
- Katzen F, Ferreira DU, Oddo CG, Ielmini MV, Becker A, Puhler A, Ielpi L, 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J Bacteriol*, 180: 1607–1617.
- Kay S, Bonas U, 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol*, 12:37–43.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U, 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318: 648–651.
- Kemp BP, Horne J, Bryant A, Cooper RM, 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* *gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiol Mol Plant Pathol*, 64:209–218.
- Killiny N, Martinez RH, Dumenyo CK, Cooksey D a, and Almeida RPP, 2013. The Exopolysaccharide of *Xylella fastidiosa* is essential for biofilm formation, plant virulence, and vector transmission. *MPMI*, 26(9):1044–1053.
- Kim H-S, Ma B, Perna NT, Charkowski AO, 2009a. Prevalence and virulence of natural type III secretion system deficient *Pectobacterium* strains. *Appl Environ Microbiol*, 75:4539–4549.
- Kim H-S, Thammarat P, Lommel SA, Hogan CS, Charkowski AO, 2011. *Pectobacterium carotovorum* elicits plant cell death with DspE/F, but does not suppress callose or induce expression of plant genes early in plant-microbe interactions. *MPMI*, 24:773–786.

- Kim JS, Sagaram US, Burns JK, Li JL, Wang N, 2009c. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology*, 99: 50–57.
- Kim KW, Ahn JJ, Lee JH, 2009b. Micromorphology of epicuticular wax structures of the garden strawberry leaves by electron microscopy: Syntopism and polymorphism. *Micron*, 40: 327–334.
- Klett P, Rott P, 1994. Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. *J Phytopathol*, 142: 283–291.
- Knief C, Delmotte N, Chaffron S, Stark M, Innerebner G, Wassmann R, von Mering C, Vorholt JA, 2012. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *The ISME J*, 6(7):1378–90.
- Koczan JM, McGrath MJ, Zhao Y, Sundin GW, 2009. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Phytopathology*, 99(11):1237–1244.
- Koebnik R, 2005. TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends in Microbiol*, 13:343–347.
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P, 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*, 37(2):239–253.
- Koplin R, Arnold W, Hotte B, Simon R, Wang G, Puhler A, 1992. Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *J Bacteriol*, 174, 191–199.
- Koutsoudis MD, Tsaltas D, Minogue TD, von Bodman SB, 2006. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *PNAS*, 103:5983–5988.
- Krishnan S, Prasadarao NV, 2012. Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *The FEBS J*, 279(6):919–931.
- Kube M, Migdoll AM, Müller I, Kuhl H, Beck A, Reinhardt R, Geider K, 2008. The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the genus *Erwinia*. *Environ Microbiol*, 10:2211–2222.
- Kukel B, Chen Z, 2006. Virulence strategies of plant pathogenic bacteria. In *The Prokaryotes*, eds M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer, New York: Springer Science, pp. 421–440.
- Lee J, Teitzel GM, Munkvold K, del Pozo O, Martin GB, Michelmore RW, Greenberg JT, 2012. Type III secretion and effectors shape the survival and growth pattern of *Pseudomonas syringae* on leaf surfaces. *Plant physiol*, 158(4):1803–1818.
- Legaz M-E, Blanch M, Piñón D, Santiago R, Fontaniella B, Blanco Y, Solas M-T, Vicente C, 2011. Sugarcane glycoproteins may act as signals for the production of xanthan in the plant-associated bacterium *Xanthomonas albilineans*. *Plant Signal Behav*, 6(8):1132–1139.
- Leveau JHJ, Lindow SE, 2001a. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *PNAS*, 98:3446–3453.

- Li J, Wang N, 2011a. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. *PLoS One*, 6(7):e21804.
- Li J, Wang N, 2011b. The *wxacO* gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. *MPP*, 12: 381–396.
- Li J, Wang N, 2012. The *gpsX* gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC microbiol*, 12(1):31.
- Lindeberg M, 2012. Genome-enabled perspectives on the composition, evolution, and expression of virulence determinants in bacterial plant pathogens. *Ann Rev phytopathol*, 50:111–132.
- Lindow SE, Andersen G, Beattie GA, 1993. Characteristics of insertional mutants of *Pseudomonas syringae* with reduced epiphytic fitness. *Appl Environ Microbiol*, 59, 1593–1601.
- Lindow SE, Brandl MT, 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Appl Environ Microbio.*, 69(4):1875–1883.
- Lindow SE, Desurmont C, Elkins R, McGourty G, Clark E, Brandl MT, 1998. Occurrence of indole-3-acetic acid-producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet. *Phytopathology*, 88: 1149–1157.
- Liu H, Coulthurst SJ, Pritchard L, Hedley PE, Ravensdale M, et al. 2008. Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathogen*, 4(6): e1000093.
- Liu H, Kang Y, Genin S, Schell MA, Denny TP, 2001. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiol*, 147(12):3215–3329.
- Liu H, Zhang S, Schell MA, Denny TP, 2005. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *MPMI*, 18:1296–1305.
- Lohaus G, 2007. Interaction between phloem transport and apoplastic solute concentrations, *In*: The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions, eds. Sattelmacher B, and Horst WJ, (University of Hannover, Germany, Springer), pp 323–336.
- Lu H, Patil P, Van Sluys M-A, White FF, Ryan RP, Dow JM, Rabinowicz P, et al. 2008. Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue specificity in *xanthomonas*. *PLoS One*, 3(11):e3828.
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J, 2010. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *MPMI*, 24 (2): 183–193.
- Marchetti M, Capela D, Glew M, Cruveiller S, Chane-Woon-Ming B, Gris C, Timmers T, et al. 2010. Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol*, 8(1):e1000280.
- Marco ML, Legac J, Lindow SE, 2005. *Pseudomonas syringae* genes induced during colonization of leaf surfaces. *Environ Microbiol*, 7: 1379–1391.

- Marguerettaz M, 2010. Rôle du système de sécrétion de type III SPI-1 et des mégaenzymes NRPS dans le cycle de vie de *Xanthomonas albilineans*, l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. Thèse de doctorat à l'université de Montpellier II : 285p.
- Marguerettaz M, Pieretti I, Gayral P, Puig J, Brin C, Cociancich S, Poussier S, Rott P, Royer M, 2011. Genomic and evolutionary features of the SPI-1 type III secretion system that is present in *Xanthomonas albilineans* but not essential for xylem colonization and symptom development in sugarcane leaf scald. *MPMI*, 24: 246–259.
- Mariano RLR, McCarter SM, 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. *Microbiol Ecol*, 26:47-58.
- Martinez C, Montillet JL, Bresson E, Agnel JP, Dai GH, Daniel JF, Geiger JP, Nicole M, 1998. Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *MPMI*, 11: 1038–1047.
- Masuch G, Schoene K, Paul VH, 1989. Histological investigations on the pathogenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *graminis* to *Lolium multiflorum*. *EPPO Bull*, 19: 73–80.
- Melotto M, Underwood W, He S, 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol*, 46:101–122.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY, 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 126:969-980.
- Meng Y, Li Y, Galvani CD, Hao G, Turner JN, et al. 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J Bacteriol*, 187:5560–5567.
- Mensi I, Girard J-C, Pieretti I, Larbre F, Roumagnac P, Royer M, Rott P, 2013. First report of sugarcane leaf scald in Gabon caused by a highly virulent and aggressive strain of *Xanthomonas albilineans*. *Plant Dis*, 97(7):988.
- Mercier J, Lindow SE, 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl Environ Microbiol*, 66:369–374.
- Meyer D, Lauber E, Roby D, Arlat M, Kroj T, 2005. Optimization of pathogenicity assays to study the *Arabidopsis thaliana*-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Mol Plant Pathol*, 6: 327-333.
- Mhedbi-Hajri N, Darrasse A, Pigné S, Durand K, Fouteau S, Barbe V, Manceau C, Lemaire C, Jacques M, 2011a. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. *BMC Evol Biol*, 11(1):67.
- Mhedbi-Hajri N, Jacques MA, Koebnik R, 2011b. Adhesion mechanisms of plant-pathogenic Xanthomonadaceae. *Adv Exp Med Biol*, 715:71-89.
- Michel G, Ball G, Goldberg JB, Lazdunski A, 2000. Alteration of the lipopolysaccharides structure affects the functioning of the *Xcp* secretory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 182:696–703.
- Miller WG, Brandl MT, Quinones B, Lindow SE, 2001. Biological sensor for sucrose availability: relative sensitivities of various reporter genes. *Appl Environ Microbiol*, 67:1308–1317.

- Milling A, Babujee L, Allen C, 2011. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. *PLoS ONE*, 6(1):e15853.
- Misas-Villamil JC, Kolodziejek I, Crabill E, Kaschani F, Niessen S, et al. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* uses proteasome inhibitor syringolin A to colonize from wound infection sites. *PLoS Pathogen*, 9(3): e1003281.
- Mohamed IS, Rott P, Davis MJ, Chatenet TM, 1996. Differentiation of strains of *Xanthomonas albilineans* based on multiplication of the pathogen in sugarcane cultivars. In Proceedings XXII Congress of the International Society of Sugarcane Technologists, Cartagena De Indias, Colombia, 5-14 September 1995, Cock J.H. and Brekelbaum T. (Eds), vol. 2, 486-492.
- Mollenhauer HH, Hopkins DL, 1974. Ultrastructural study of Pierce's disease bacterium in grape xylem tissue. *J Bacteriol*, 119: 612–618.
- Monaghan J, Zipfel C, 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin Plant Biol*, 15: 349–357.
- Monier JM, Lindow SE, 2003. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *PNAS*, 100:15977–15982.
- Monier JM, Lindow SE, 2004. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 70(1):346–355.
- Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Van Sluys M, Kitajima JP, Truffi D, do Amaral AM, Harakava R, et al. 2004. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *MPMI*, 17(8):827–836.
- Montesinos E, Bonaterra A, Badosa E, Francés J, Alemany J, Llorente I, Moragrega C, 2002. Plant microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int Microbiol*, 5: 169-175.
- Morris CE, Monier JM, Jacques MA, 1998. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*, 64: 4789–4795.
- Mossialos D, Ochsner U, Baysse C, Chablain P, Pirnay J-P, Koedam N, Budzikiewicz H, Fernández DU, Schäfer M, Ravel J, Cornelis P, 2002. Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol*, 45 (6) : 1673–1685.
- Müller C, Riederer M, 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *J Chem Ecol*, 31 : 2621–2651.
- Muller S, Bley T, Babel W, 1999. Adaptive responses of *Ralstonia eutropha* to feast and famine conditions analysed by flow cytometry. *J Biotechnol*, 75(2–3):81–97.
- Nakao R, Ramstedt M, Wai SN, Uhlin BE, 2012. Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS ONE*, 7(12): e51241.
- Nardini A, Salleo S, Jansen S, 2011. More than just a vulnerable pipeline: xylem physiology in the light of ion-mediated regulation of plant water transport. *J Exp Bot*, 62(14):4701–4718.

- Newman MA, Dow JM, Daniels MJ, 2001. Bacterial lipopolysaccharides and plant–pathogen interactions. *Eur J Plant Pathol*, 107: 95–102.
- Nino-Liu D, Ronald P, Bogdanove AJ, 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol Plant Pathol*, 7:303–324.
- Ojanen-Reuhs T, Kalkkinen N, Westerlund-Wikstrom B, van Doorn J, Haahtela K, Nurmiaho-Lassila EL, Wengelnik K, Bonas U, Korhonen TK, 1997. Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*, 179 : 1280-1290.
- Ojanen T, Helander IM, Haahtela K, Korhonen TK, Laakso T, 1993. Outer-membrane proteins and lipopolysaccharides in pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Appl Environ Microb*, 59: 4143–4151.
- Orian G, 1942. Artificial hosts of the sugarcane leaf scald organism. *Revue Agricole et Sucrière de l'Ile Maurice*, 21:285-304.
- Ott PG, Varga GJ, Szatmari A, Bozso Z, Klement E, Medzihradsky KF, Besenyi E, Czegleng A, Klement Z, 2006. Novel extracellular chitinases rapidly and specifically induced by general bacterial elicitors and suppressed by virulent bacteria as a marker of early basal resistance in tobacco. *MPMI*, 19: 161–172.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C, 2005. Peroxidases have more functions than a swiss army knife. *Plant Cell Rep*, 24:255–265.
- Peñuelas J, Llusà J, 2004. Plant VOC emissions: making use of the unavoidable. *Trends Ecol Evol*, 19 : 402-404.
- Pérez-Donoso AG, Sun Q, Roper MC, Greve LC, Kirkpatrick B, Labavitch JM, 2010. Cell wall-degrading enzymes enlarge the pore size of intervessel pit membranes in healthy and *Xylella fastidiosa*-infected grapevines. *Plant physiol*, 152(3):1748–1759.
- Pérombelon MCM, 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol*, 51: 1–12.
- Petrocelli S, Tondo ML, Daurelio LD, Orellano EG, 2012. Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* lipopolysaccharide affect the basal response and the virulence process during citrus canker. *PLoS ONE*, 7(7): e40051.
- Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Cociancich S, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques MA, Lauber E, Manceau C, Mangenot S, Poussier S, Segurens B, Szurek B, Verdier V, Arlat M, Rott P, 2009. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics*, 10:616.
- Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques MA, Lauber E, Manceau C, Mangenot S, Poussier S, Segurens B, Szurek B, Verdier V, Arlat M, Gabriel DW, Rott P, Cociancich S, 2012. Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC Genomics*, 13:658.
- Pitman AR, Harrow SA, Visnovsky SB, 2010. Genetic characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing soft-rot disease of potato in New Zealand. *Eur J Plant Pathol*, 126:423–435.
- Poplawsky AR, Chun W, 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. *MPMI*, 11(6): 466-475.

- Poplawsky AR, Chun W, Slater H, Daniels MJ, Dow JM, 1998. Synthesis of extracellular enzymes, and xanthomonadin in *Xanthomonas campestris*: evidence for the involvement of two intercellular regulatory signals. *MPMI*, 11:68–70.
- Poueymiro M, Genin S, 2009. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr Opin Microbiol*, 12(1):44–52.
- Preston GM, Bertrand N, Rainey PB, 2001. Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Mol Microbiol*, 41: 999–1014.
- Priebe GP, Dean CR, Zaidi T, Meluleni GJ, Coleman FT, Coutinho YS, Noto MJ, Urban TA, Pier GB, Goldberg JB, 2004. The *galU* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is required for corneal infection and efficient systemic spread following pneumonia but not for Infection confined to the lung. *Infect. Immun*, 72(7):4224–4232.
- Prost LR, Sanowar S, Miller SI, 2007. Salmonella sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages. *Immunol Rev*, 219:55–65.
- Purcell AH, Hopkins DL, 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 34:131–151.
- Qian W, Jia Y, Ren SX, He YQ, Feng JX, Lu LF, Sun Q, Ying G, Tang DJ, Tang H, Wu W, Hao P, Wang L, Jiang BL, Zeng S, Gu WY, Lu G, Rong L, Tian Y, Yao Z, Fu G, Chen B, Fang R, Qiang B, Chen Z, Zhao GP, Tang JL, He C, 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res*, 15 (6): 757–767.
- Quinones B, Dulla G, Lindow SE, 2005. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *MPMI*, 18:682–693.
- Quinones B, Pujol CJ, Lindow SE, 2004. Regulation of AHL production and its contribution to epiphytic fitness in *Pseudomonas syringae*. *MPMI*, 17:521–531.
- Rae AL, Grof CPL, Casu RE, Bonnett GD, 2005. Sucrose accumulation in the sugarcane stem: pathways and control points for transport and compartmentation. *Field Crops Res*, 92: 159–168.
- Rahman MA, Abdullah H, and Vanhaecke M, 1999. Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annuum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. *J Phytopathol*, 147: 129–140.
- Rajogopal, L, Sundari, CS, Balasubramanian, D, Sonti, RV. 1997. The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett* 415: 125–128.
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C, 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr Opin Microbiol*, 7(6):602–609.
- Rastogi G, Sbodio A, Tech JJ, Suslow TV, Coaker GL, Leveau JHJ, 2012. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *The ISME J*, 6(10):1812–22.
- Ray SK, Rajeswari R, Sharma Y, Sonti RV, 2002. A high molecular weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. *Mol Microbiol*, 46:637–647.
- Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N, 2010. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ*

microbiol, 12(11):2885–93.

Remenant B, de Cambiaire J-C, Cellier G, Jacobs JM, Mangenot S, Barbe V, Lajus A, et al. 2011. *Ralstonia syzygii*, the blood disease bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *PloS One*, 6(9):e24356.

Remus-Emsermann MNP, de Oliveira S, Schreiber L, Leveau JHJ, 2011. Quantification of lateral heterogeneity in carbohydrate permeability of isolated plant leaf cuticles. *Front Microbiol*, 2:197.

Renier A, Vivien E, Cociancich S, Letourmy P, Perrier X, Rott P, Royer M, 2007. Substrate specificity-conferring regions of the non ribosomal peptide synthase adenylation domains involved in albicidin pathotoxin biosynthesis are highly conserved within species *Xanthomonas albilineans*. *Appl Environ Microbiol*, 73: 5523-5530.

Ricaud C, Ryan CC, 1989. Leaf scald. In: Diseases of Sugarcane, Major Diseases, eds. Ricaud C, Egan BT, Gillaspie AG Jr, and Hughes CG, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 39–58.

Rico A, Jones R, Preston GM, 2009. Adaptation to the plant apoplast by plant pathogenic bacteria, in: Plant pathogenic bacteria: Genomics and molecular biology, eds. Robert WJ, School of Biological Sciences, (Whiteknights, Reading UK), pp 63-89.

Rico A, Preston GM, 2008. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *MPMI*, 21(2):269–282.

Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, Sendin L, Filippone P, et al. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *MPMI*, 20: 1222–1230.

Ristow P, Bourhy P, Weykamp da Cruz MF, Pereira Figueira C, Huerre M, Ave P, Saint Girons I, Ko AI, Picardeau M, 2007. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PloS Pathog*, 3(7) e97.

Rocher F, Chollet J-F, Jousse C, Bonnemain J-L, 2006. Salicylic acid, an ambimobile molecule exhibiting a high ability to accumulate in the phloem. *Plant Physiol*, 141: 1684–1693.

Roine E, Raineri DM, Romantschuk M, Wilson M, Nunn DN, 1998. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *MPMI*, 11: 1048–1056.

Rojas CM, Ham JH, Deng W-L, Doyle JJ, Collmer A, 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *PNAS*, 99(20):13142–13147.

Romantschuk M, Bamford D, 1986. The causal agent of halo blight in bean, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, attaches to stomata via its pili. *Microb Pathog*, 1:139–148.

Roper M, 2011. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. *Mol plant pathol*, 12:628–637.

Roper MC, Greve LC, Warren JG, Labavitch JM, Kirkpatrick BC, 2007. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *MPMI*, 20(4):411–419.

Rott P, Arnaud M, Baudin P, 1986. Serological and lysotypical variability of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, causal agent sugarcane leaf scald disease. *J Phytopathol*, 116: 201-211.

Rott P, Bailey RA, Comstock JC, Croft BJ, Saumtally AS, 2000. A guide to sugarcane diseases. CIRAD and ISSCT, Montpellier, France, 339 p.

Rott P, Davis MJ, 2000. Leaf scald. In: A Guide to Sugarcane Diseases, eds. Rott P, Bailey RA, Comstock JC, Croft BJ et Saumtally AS, (CIRAD and ISSCT, Montpellier, France), pp 38-44.

Rott P, Davis MJ, Baudin P, 1994. Serological variability of *Xanthomonas albilineans*, causal agent sugarcane leaf scald disease. *Plant Pathol*, 43:344-349.

Rott P, Fleites L, Marlow G, Royer M, Gabriel DW, 2009. Quorum sensing genes *rpfF* and *xanB2* are not essential for albicidin production nor sugarcane colonisation by *Xanthomonas albilineans*. In: *Abstracts of the 2009 Meeting of the XIV International Congress on Molecular Plant- Microbe Interactions*, July 19–23, Quebec City, Canada.

Rott P, Fleites L, Marlow G, Royer M, Gabriel DW, 2011. Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. *MPMI*, 24 (5):594-605.

Rott P, Fleites LA, Mensi I, Sheppard L, Daugrois JH, Dow M, Gabriel DW, 2013. The RpfCG two-component system negatively regulates the colonization of sugarcane stalks by *Xanthomonas albilineans*. *Microbiol*, 159:1149-1159.

Rott P, Soupa D, Brunet Y, Feldmann P, Letourmy P, 1995. Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivars. *Plant Pathol*, 44:1705-1084.

Royer M, Costet L, Vivien E, Bes M, Cousin A, Damais A, Pieretti I, Savin A, Megessier S, Viard M et al, 2004. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. *MPMI*, 17:414 - 427.

Royer M, Koebnik R, Marguerettaz M, Barbe V, Robin GP, Brin C, Carrere S, Gomez C, Hügelland M, Völler G, Noëll J et al., 2013. Genome mining indicates that the genus *Xanthomonas* is a promising reservoir for new bioactive non-ribosomally synthesized peptides. *BMC Genomics*, accepté.

Rudolph K, 1993. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas* (Swings JG and Giverolo EL, eds) Chapman & Hall, London, pp 193-264.

Ruppel S, Krumbein A, Schreiner M, 2008. Composition of the phyllospheric microbial populations on vegetable plants with different glucosinolate and carotenoid compositions. *Microb Ecol*, 56 : 364-372.

Russell AB, Hood RD, Bui NK, Leroux M, Vollmer W, Mougous JD, 2011. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 475: 343–347.

Ryan PR, Dow MJ, 2011. Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends Microbiol*, 19(3) : 145-152.

Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Jiang BL, He YQ, Feng JX, Tang JL, Dow JM, 2007. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol*, 63: 429–442.

Ryan RP, Vorhölter FJ, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, Dow JM, 2011. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Rev*, 9(5): 344-355.

- Sakurai N, 1998. Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *J Plant Res*, 111(1):133–148.
- Salzberg SL, Sommer DD, Schatz MC, Phillippy AM, Rabinowicz PD, et al. 2008. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics*, 9:204.
- Sattelmacher B, 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol*, 22:167–192.
- Schellenberg B, Ramel C, Dudler R, 2010. *Pseudomonas syringae* virulence factor syringolin A counteracts stomatal immunity by proteasome inhibition. *MPMI*, 23(10):1287–1293.
- Schikora A, Carreri A, Charpentier E, Hirt H, 2008. The dark side of the salad: *Salmonella typhimurium* overcomes the innate immune response of *Arabidopsis thaliana* and shows an endopathogenic lifestyle. *PloS One*, 3(5):e2279.
- Schonherr J, 2006. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *J Exp Bot*, 57:2471–2491.
- Schreiber L, Krimm U, Knoll D, Sayed M, Auling G, and Kroppenstedt RM, 2005. Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytol*, 166(2):589–94.
- Scortecci KC, Creste S, Calsa JT, Xavier MA, Landell MGA, Figueira A, Benedito VA, 2012. Challenges, opportunities and recent advances in sugarcane breeding, *In: Plant Breeding*. Eds. Abdurakhmonov I, *In Tech Europe*, pp: 267-296.
- Sebaihia M, Bocsanczy AM, Biehl BS, Quail MA, Perna NT, Glasner JD, DeClerck GA, Cartinhour S, Schneider DJ, Bentley SD, Parkhill J, Beer SV, 2010. Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. *J Bacteriol*, 192: 2020–2021.
- Shepherd R, Wagner G, 2007. Phylloplane proteins: emerging defenses at the aerial frontline? *Trends Plant Sci*, 12(2):1360–1385.
- Sidhu VK, Vorhölter F-J, Niehaus K, Watt SA, 2008. Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiol*, 8:87.
- Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, and Mougous JD, 2012. Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annual Rev Microbiol*, 66:453–472.
- Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, Alves LM, Araya JE, Baia GS, Baptista CS, et al. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, 406: 151–159.
- Smith SGJ, Mahon V, Lambert Ma, and Fagan RP, 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol lett*, 273(1):1–11.
- Smits THM, Rezzonico F, Kamber T, Blom J, Goesmann A, Frey JE, Duffy B, 2010. Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *MPMI*, 23:384-393.
- Solomon PS, Tan K, Oliver RP, 2003. The nutrient supply of pathogenic fungi: A fertile field for study. *Mol Plant Pathol*, 4:203-210.

- Soopramanien GC, 2000. Sugarcane morphology, anatomy and physiology. In: A Guide to Sugarcane Diseases. eds. Rott P, Bailey RA, Comstock JC, Croft BJ et Saumtally AS, CIRAD and ISSCT, Montpellier, France, pp. 13-20.
- Sordi RA, Tokeshi H, 1986. Presence of *Xanthomonas albilineans* in guttation droplets of sugarcane and sweet corn leaves showing leaf scald disease symptoms. Sociedade dos Técnicos Açucareiros do Brasil, 4(Jul./Aug.), 60-63.
- Souza LCA, Wulff NA, Gaurivaud P, Mariano AG, Virgilio ACD, et al. 2006. Disruption of *Xylella fastidiosa* CVC gumB and gumF genes affect biofilm formation without a detectable difference in exopolysaccharide production. *FEMS Microbiol Lett*, 257:236–242.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW, 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 56:187–209.
- Stromberg KD, Kinkel LL, Leonard KJ, 1999. Relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. *Phytopathology*, 89:131–135.
- Studholme D, Wasukira A, Paszkiewicz K, Aritua V, Thwaites R, Smith J, Grant M, 2011. Draft genome sequences of *Xanthomonas sacchari* and two banana-associated xanthomonads reveal insights into the *Xanthomonas* group 1 clade. *Genes*, 2:1050–1065.
- Studholme D, Wasukira A, Paszkiewicz K, Aritua V, Thwaites R, Smith J, Grant M, 2012. Correction: Studholme *et al.*, Draft genome sequences of *Xanthomonas sacchari* and two banana-associated xanthomonads reveal insights into the *Xanthomonas* group 1 clade. *Genes* 3:88-89.
- Sun QH, Hu J, Huang GX, Ge C, Fang RX, He CZ, 2005. Type II secretion pathway structural gene xpsE, xylanase and cellulose secretion and virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathol*, 54: 15–21.
- Sun Z-L, Li M-Z, Chen J, Li Y-Q, 2006. Physiological effect of the toxin from *Xanthomonas retroflexus* on redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*). *African J Biotechnol*, 5(22): 2307-2311.
- Sundin GW, Jacobs JL, 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb Ecol*, 38: 27–38.
- Surico G, 1993. Scanning electron microscopy of olive and oleander leaves colonized by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *J Phytopathol*, 138:31-40.
- Szczesny R, Jordan M, Schramm C, Schulz S, Cogez V, Bonas U, Büttner D, 2010. Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *New Phytol*, 187:983–1002.
- Tang JL, Liu YN, Barber CE, Dow JM, Wootton JC, Daniels MJ, 1991. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet*, 226:409–417.
- Tans-Kersten J, Huang H, Allen C, 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol*, 183:3597–3605.

- Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Büttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klöggen U, Patschkowski T, Rückert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorhölter FJ, Weber E, Pühler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O, 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol*, 187(21): 7254-7266.
- Toth IK, Bell KS, Holeyva MC, Birch PRJ, 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol Plant Pathol*, 4:17–30.
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Kunkel BN, Anand A, Mysore KS, Bender CL, 2007. The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *MPMI*, 20 : 955–965.
- Vallade J, 2001. Structure et développement de la plante : Morphogenèse et biologie de la reproduction des Angiospermes. (Dunod, Paris), 223 p.
- van Bel AJE, Gaupels F, 2004. Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. *Mol Plant Pathol*, 5:495– 504.
- van den Mooter M, Swings J, 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features of *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *Int J Syst Bacteriol*, 40 :348-369.
- van der Wal A, Leveau JHJ, 2011. Modelling sugar diffusion across plant leaf cuticles: the effect of free water on substrate availability to phyllosphere bacteria. *Environ Microbiol*, 13(3):792-797.
- Van Dillewijn C, 1960. Botanique de la canne à sucre. Hoveenman et Zonen NV, Amsterdam, Netherlands, 321 p.
- van Doorn J, Boonekamp PM, Oudega B, 1994. Partial characterization of fimbriae of *Xanthomonas campestris* pathovar *hyacinthi*. *MPMI*, 7: 334–344.
- Vandroemme J, Baeyen S, Cottyn B, de Vos P, Maes M, 2012 Draft genome sequencing of *Xanthomonas fragariae* reveals reduced genome size and distinct virulence gene content. In Book of abstracts, p10. 4th *Xanthomonas* Genomics Conference, July 9-12, 2012. Angers, France: INRA.
- Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Menck CF, Da Silva AC, Ferro JA, Oliveira MC, Setubal JC, Kitajima JP, Simpson AJ, 2002. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 40: 169-189.
- Vasse J, Frey P, Trigalet A, 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *MPMI*, 8(2): 241–251.
- Vauterin L, Hoste B, Yang P, Alvarez A, Kersters K, Swings J, 1993. Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas* (Swings JG and EL Civerolo, eds), Chapman & Hall, London, pp 157–192.
- Vinatzter BA, Teitzel GM, Lee M-W, Jelenska J, Hotton S, Fairfax K, Jenrette J, Greenberg JT, 2006. The type III effector repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and its role in survival and disease on host and non-host plants. *Mol Microbiol*, 62(1):26–44.
- Vojnov AA, Zorreguieta A, Dow JM, Daniels MJ, Dankert MA, 1998. Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiol*, 144: 1487–1493.

- Von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL, 2003. Quorum sensing in plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 41: 455-482.
- Vorholt JA, 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Rev Microbiol*, 10(12):828–40.
- Vorhölter F-J, Schneiker S, Goesmann A, Krause L, Bekel T, Kaiser O, Linke B, et al. 2008. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotechnol*, 134(1-2):33–45.
- Wallis CM, Chen J, 2012. Grapevine phenolic compounds in xylem sap and tissues are significantly altered during infection by *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*, 102(9):816–826.
- Wang JC, So BH, Kim JH, Park YJ, Lee BM, Kang HW, 2008. Genome wide identification of pathogenicity genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by transposon mutagenesis. *Plant Pathol*, 57(6):1136-1145.
- Wang L, Makino S, Subedee A, Bogdanove AJ, 2007. Novel candidate virulence factors in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as revealed by mutational analysis. *Appl Environ Microbiol*, 73:8023–8027.
- Wang LH, He Y, Gao Y, Wu JE, Dong Y-H, He C, Wang SX, Weng LX, Xu JL, Tay L, et al., 2004. A bacterial cell–cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol*, 51:903–912.
- Wang Y, Kim KS, 2002. Role of OmpA and IbeB in *Escherichia coli* K1 invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Pediatric Res*, 19 (51):559-563.
- Waspi U, Blanc D, Winkler T, Raedi P, Dudler R, 1998. Syringolin, a novel peptide elicitor from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that induces resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *MPMI*, 11: 727-733.
- Welbaum GE, Meinzer FC, Grayson RL, Thornham KT, 1992. Evidence for the consequences of a barrier to solute diffusion between the apoplast and vascular bundles in sugarcane stalk tissue. *Australian J Plant Physiol*, 19(6):611–623.
- Whipps JM, Hand P, Pink D, Bending GD, 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol*, 105(6):1744–55.
- Wilbrink G, 1920. De Gomziekte van het Suikerriet, hare Oorzaak en hare Bestrijding. *Arch. Suikerind. Ned. Indie*, 28: 1399–1525.
- Wilson M, Hirano SS, Lindow SE, 1999. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Appl Environ Microbiol*, 65: 1435–1443.
- Wilson M, Lindow SE, 1994. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl Environ Microbiol*, 60:4468–4477.
- Woodward FI, Lomas MR, 2004. Vegetation dynamics – simulating responses to climatic change. *Biol Rev*, 79 : 643–670.
- Xu J, Platt TG, Fuqua C, 2012. Surfactant during swarming behavior□: regulatory linkages between flagella and surfactant during swarming behavior□: lubricating the flagellar propeller□? *J Bacteriol*, 194 (6): 1283–1286.

- Yadav RKP, Karamanoli K, Vokou D, 2005. Bacterial colonization of the phyllosphere of mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microb Ecol*, 50: 185-196.
- Yadeta KA, Thomma BPHJ, 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front Plant Sci*, 4:97.
- Yao J, Allen C, 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol*, 188(10):3697–3708.
- Yephremov A, Schreiber L, 2005. The dark side of the cell wall: molecular genetics of plant cuticle. *Plant Biosys*, 139 : 74–79.
- Young JM, Park DC, Shearman HM, Fargier E, 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol*, 31:366–377.
- Young SA, Cuo A, Cuikema JA, White F, Leach JE, 1995. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Physiol*, 107: 1333–1341.
- Yu J, Penaloza-Vazquez A, Chakrabarty AM, Bender CL, 1999. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Microbiol*, 33:712–720.
- Yu X, Lund SP, Scott RA, Greenwald JW, Records AH, Nettleton D, Lindow SE, Gross DC, Beattie GA, 2013. Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. *PNAS*, 110 (5):E425–E434.
- Yun MH, Torres PS, El Oirdi, M, Rigano LA, Gonzalez-Lamothe R, Marano MR, Castagnaro AP, Dankert MA, Bourab K, Vojnov AA, 2006. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol*, 141: 178–187.
- Zeng W, He SY, 2010a. A prominent role of the flagellin receptor FLS2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 153: 1188–1198.
- Zeng W, Melotto M, SY He, 2010b. Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Curr Opin Biotechnol*, 21:599–603.
- Zhang Y, Callaway EM, Jones JB, Wilson M, 2009. Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. *Eur J Plant Pathol*, 124(3) : 379–390.
- Zheng X, Spivey NW, Zeng W, Liu P, Fu ZQ, Klessig DF, 2012. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe*, 11(6):587–596.
- Zou H-S, Song X, Zou L-F, Yuan L, Li Y-R, Guo W, Che Y-Z, Zhao W-X, Duan Y-P, Chen G-Y, 2012. EcpA, an extracellular protease, is a specific virulence factor required by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* but not by *X. oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Microbiol*, 158: 2372-2383.

Annexes

Annexes

Résultats complémentaires

Annexe 1 : Fleites L, Mensi I, Gargani D, Zhang S, Rott P, Gabriel DW, 2013. *Xanthomonas albilineans* OmpA1 appears to be functionally modular and both the OMC and C-like domains are necessary for leaf scald disease of sugarcane. *MPMI*, 26 (10): 1200–1210.

Abstract

Several EZ-Tn5 insertions in gene locus XALc_0557 (OmpA1) of the sugarcane leaf scald pathogen *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 were previously found to strongly affect pathogenicity and endophytic stalk colonization. XALc_0557 has a predicted OmpA N-terminal outer membrane channel (OMC) domain and an OmpA C-like domain. Further analysis of mutant M468, with an EZ-Tn5 insertion in the upstream OMC domain coding region, revealed impaired epiphytic and endophytic leaf survival, impaired resistance to sodium dodecyl sulfate (SDS), structural defects in the outer membrane (OM), and hyperproduction of OM vesicles. Cloned full-length XALc_0557 complemented M468 for all phenotypes tested, including pathogenicity, resistance to SDS, and ability to survive both endophytically and epiphytically. Another construct, pCT47.3, which expressed only the C-like domain of XALc_0557, restored resistance to SDS in M468 but failed to complement any other mutant phenotype, indicating that the C-like domain functioned independently of the OMC domain to help maintain OM integrity. pCT47.3 also complemented pathogenicity, resistance to SDS, and stalk colonization in mutant M1152, which carries an EZ-Tn5 insert in the C-like coding region, indicating that both predicted domains are modular and necessary but neither is sufficient for *X. albilineans* pathogenicity, endophytic survival in, and epiphytic survival on sugarcane.

Xanthomonas albilineans OmpA1 Appears to be Functionally Modular and Both the OMC and C-like Domains Are Necessary for Leaf Scald Disease of Sugarcane

Laura A. Fleites,¹ Imène Mensi,² Daniel Gargani,² Shujian Zhang,¹ Philippe Rott,² and Dean W. Gabriel¹

¹Department of Plant Pathology, University of Florida, Gainesville 32605, U.S.A.; ²CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France

Submitted 4 January 2013. Accepted 28 May 2013.

Several EZ-Tn5 insertions in gene locus XALc_0557 (OmpA1) of the sugarcane leaf scald pathogen *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 were previously found to strongly affect pathogenicity and endophytic stalk colonization. XALc_0557 has a predicted OmpA N-terminal outer membrane channel (OMC) domain and an OmpA C-like domain. Further analysis of mutant M468, with an EZ-Tn5 insertion in the upstream OMC domain coding region, revealed impaired epiphytic and endophytic leaf survival, impaired resistance to sodium dodecyl sulfate (SDS), structural defects in the outer membrane (OM), and hyperproduction of OM vesicles. Cloned full-length XALc_0557 complemented M468 for all phenotypes tested, including pathogenicity, resistance to SDS, and ability to survive both endophytically and epiphytically. Another construct, pCT47.3, which expressed only the C-like domain of XALc_0557, restored resistance to SDS in M468 but failed to complement any other mutant phenotype, indicating that the C-like domain functioned independently of the OMC domain to help maintain OM integrity. pCT47.3 also complemented pathogenicity, resistance to SDS, and stalk colonization in mutant M1152, which carries an EZ-Tn5 insert in the C-like coding region, indicating that both predicted domains are modular and necessary but neither is sufficient for *X. albilineans* pathogenicity, endophytic survival in, and epiphytic survival on sugarcane.

Xanthomonas albilineans is a gram-negative, xylem-invading phytopathogen that causes sugarcane leaf scald disease (Rott and Davis 2000). *X. albilineans* is close in phylogeny to the systemic xylem-limited pathogen *Xylella fastidiosa* (Pieretti et al. 2009). Like *X. fastidiosa*, *Xanthomonas albilineans* does not have a hypersensitive response and pathogenicity (*hrp*) type III secretion system (T3SS), and is one of only six phytopathogenic bacteria known to have a *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) T3SS, which is associated with animal pathogens and insect endosymbionts (Cornelis 2006; Dale et al. 2001, 2004; Marguerettaz et al. 2010). Furthermore, *X. albilineans* is

the only known xanthomonad that does not produce xanthan gum (Pieretti et al. 2009). The only well-characterized *X. albilineans* pathogenicity factor described to date is albicidin, an antibiotic and DNA gyrase inhibitor that blocks chloroplast differentiation and is responsible for (nearly) all of the foliar symptoms of leaf scald caused by most *X. albilineans* strains (Birch and Patil 1985, 1987a and b; Hashimi et al. 2007). However, there is evidence for additional pathogenicity factors. For example, XaFL07-1 mutant $\Delta albXXI$, which does not produce albicidin, is still able to cause foliar symptoms of leaf scald on sugarcane ‘CP80-1743’, including chlorosis, necrosis, and diagnostic pencil-line stripes (Rott et al. 2011). In addition, albicidin-deficient mutants, including those causing no symptoms, are well able to endophytically colonize sugarcane (Birch 2001; Champoiseau et al. 2006a). Therefore, ability to colonize sugarcane is more fundamental to *X. albilineans* population fitness than ability to cause symptoms of leaf scald; colonization does not depend upon elicitation of pathogenic symptoms.

A search for additional pathogenicity factors in XaFL07-1 using random EZ-Tn5 mutagenesis resulted in 61 mutants with reduced ability to cause disease symptoms or colonize the sugarcane stalk (Rott et al. 2011). Surprisingly, 5 of the 61 (8.2%) were localized to a single gene, the 1,101-bp *X. albilineans* *ompA1* gene (locus tag XALc_0557). XALc_0557 is predicted to encode two distinct domains: an OmpA N-terminal outer membrane channel (OMC) domain (porin superfamily) and an OmpA C-like domain (Fig. 1).

OmpA is the most abundant outer membrane (OM) protein in Enterobacteria (Bosshart et al. 2012); it is present at 100,000 copies per cell in *Escherichia coli* (Koebnik et al. 2000). OmpA of *E. coli* has been found to fold into both open and closed conformations. The predominant state is the closed form, also known as the majority conformer. In this form, the OMC domain folds into an eight-stranded β -barrel and the C-like domain is anchored in the periplasm via noncovalent interactions with the bacterial cell wall (Arora et al. 2000; Nikaido 2003; Smith et al. 2007). The eight-stranded β barrel of the OMC domain of OmpA is thought to allow the passage of ions, although the crystal structure does not show a continuous passage (Pautsch and Schulz 1998). There is evidence of an ion-gating mechanism involving the modification of a salt bridge, allowing the formation of a small pore (Arora et al. 2000; Bond et al. 2002; Smith et al. 2007). The open conformation of OmpA, also known as the minority conformer, was first discovered in unilamellar proteoliposomes in approxi-

Corresponding author: D. Gabriel; E-mail: dgabr@ufl.edu

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that three supplementary figures are published online.

© 2013 The American Phytopathological Society

mately 2 to 3% of the OmpA molecules examined (Sugawara and Nikaido 1992). In the open form, OmpA forms a 16-stranded β -barrel, which would produce a channel large enough for the passage of solutes. Existence of both OmpA forms was confirmed in *Salmonella enterica* (Singh et al. 2003).

The OMC domain of OmpA can function without the C-like domain, as in the case of gram-negative porins. Porins form nonspecific channels for small hydrophilic molecules. The major porins, such as OmpC and OmpF of *E. coli* (which form 16-stranded β -barrels and associate in the OM as trimers), have a single OMC domain that extends through most of the protein (Achouak et al. 2001).

In several species of animal pathogens, OmpA has been shown to play a critical role in virulence. In *Cronobacter sakazakii* (formerly *Enterobacter sakazakii*), OmpA[−] mutants were 87% less invasive than the wild type in human cells (Mohan Nair and Venkitanarayanan 2007; Singamsetty et al. 2008). Similarly, OmpA[−] mutants of *Escherichia coli* were less able to invade C6 glioma cells (Wu et al. 2009), less invasive in brain endothelial cells, and less able to penetrate the blood-brain barrier than their wild-type counterparts (Wang and Kim 2002). OmpA[−] mutants of *E. coli* were also shown to be less able to form biofilms on various surfaces (Barrios et al. 2006; Ma and Wood 2009).

Although mutations of *ompA* in a variety of bacteria have been reported, multiple reports also exist documenting difficulty in cloning and expressing *ompA* or homologs from a variety of bacterial strains in *E. coli*: *ompA* of *E. coli* (Bremer et al. 1980), *ompA* of *Shigella dysenteriae* (Braun and Cole 1982), *omp1* of *Fusobacterium nucleatum* (Bolstad and Jensen 1993), *ompU* of *Vibrio cholerae* (Sperandio et al. 1996), *ompH* of *Pasteurella multocida* (Lee et al. 2004), and *mopB* of *Xylella fastidiosa* (Bruening et al. 2005 and 2007). Some reports hypothesized that the difficulty in expression might be due to toxicity of the foreign OmpA hydrophobic domains on the host cell (Laage and Langosch 2001).

Much less is known about the function of OmpA-like proteins in phytopathogenic bacteria. MopB, an OmpA-like protein in *X. fastidiosa*, was associated with chlorosis-inducing activity on the indicator plant *Chenopodium quinoa* (Bruening et al. 2002) and also with adhesion to xylem-rich balsa wood and cellulose disks (Bruening et al. 2003). Additionally, a knockout mutant of the OmpA-like MopB protein from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* was highly pleiotropic and no longer pathogenic to cabbage (*Brassica* sp.); in vitro, cells aggregated abnormally; were more sensitive to high temperatures, sodium dodecyl sulfate (SDS) and alkaline pH; and were deficient in exopolysaccharide production, adhesion, and motility (Chen et al. 2010). Notably, no distinction was made

between in planta survival or growth and elicitation of pathogenic symptoms in these studies.

We previously reported that the XALc_0557 EZ-Tn5 insertion mutants M468 and M1152, with insertions interrupting the OMC and C-like domains, respectively, of XALc_0557, had lost pathogenicity and ability to colonize sugarcane stalks, and exhibited reduced growth in vitro (Rott et al. 2011). Interestingly, a third reported Tn5 insertion mutant, M768, with an insertion site between the two domains (Fig. 1), inconsistently retained a low level of both pathogenicity and ability to colonize sugarcane stalks. The purposes of this study were to i) utilize complementation and additional in vitro and in planta assays to better characterize the pleiotropic functions of XALc_0557, ii) more closely examine the functions of the predicted OMC and C-like domains of XALc_0557 to determine whether the domains are independently functional, and iii) help define their individual roles in *X. albilineans* epiphytic survival, endophytic colonization, and pathogenesis of sugarcane.

RESULTS

XALc_0557 stabilizes the OM of *X. albilineans*.

Cells of wild-type XaFL07-1 exhibited a regularly shaped, relatively smooth OM (Fig. 2A), whereas the OM proteins of all three mutants were rougher and irregularly shaped (Fig. 2B to D). Additionally, the cells of M468 and M768 appeared thinner (reduced diameter) by transmission electron microscopy (TEM) than those of the wild-type strain and M1152. Both mutants M468 and M768 also seemed to have smaller electron transparent inclusion bodies than the wild type and M1152 by TEM. Although XaFL07-1 produced OM vesicles (OMV), those produced by all three mutants were much more abundant and also larger in size by both TEM (Fig. 2A to D) and scanning electron microscopy (SEM) (Fig. 2E to H). However, M1152 hyperproduced OMV to a level at least 10x greater than the other two mutants, with some cells completely covered with OMV (Fig. 2H), and others were also present with very few or no OMV. Additionally, TEM revealed faulty septation and highly elongated cells with M468 that were less evident in M768 and not at all evident in M1152 (Fig. 2A to D).

To further investigate potential defects in the OM, growth in the presence of SDS was examined. Both XaFL07-1 and M768 were able to grow well in Modified Wilbrinks (MW) medium supplemented with SDS at 25 ppm, whereas M468 and M1152 were both strongly inhibited in growth on this medium (Supplementary Fig. S1). The EZ-Tn5 insertion in M768 was confirmed to be stable. These results indicated that the M468 and M1152 mutations in XALc_0557 perturbed the OM barrier function of *X. albilineans*, and that EZ-Tn5 mutations in M468 and M1152 were more severe than the EZ-Tn5 mutation in M768.

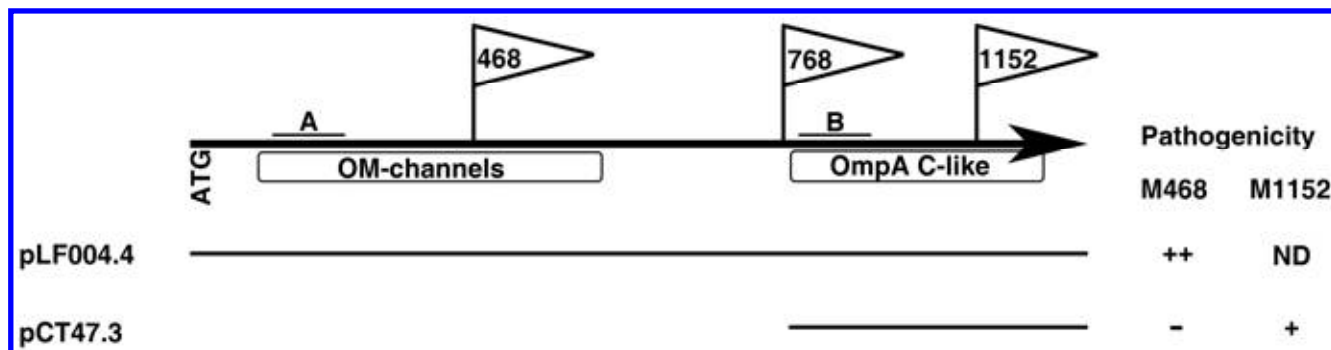


Fig. 1. Location of the M468, M768, and M1152 Tn5 insertions in the XALc_0557 gene relative to the regions used to create the complementation constructs. Region A is the region assayed by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) with primer set OmpANtermF + OmpANtermR. Region B is the region assayed by RT-qPCR with primer set OmpACtermF + OmpACtermR.

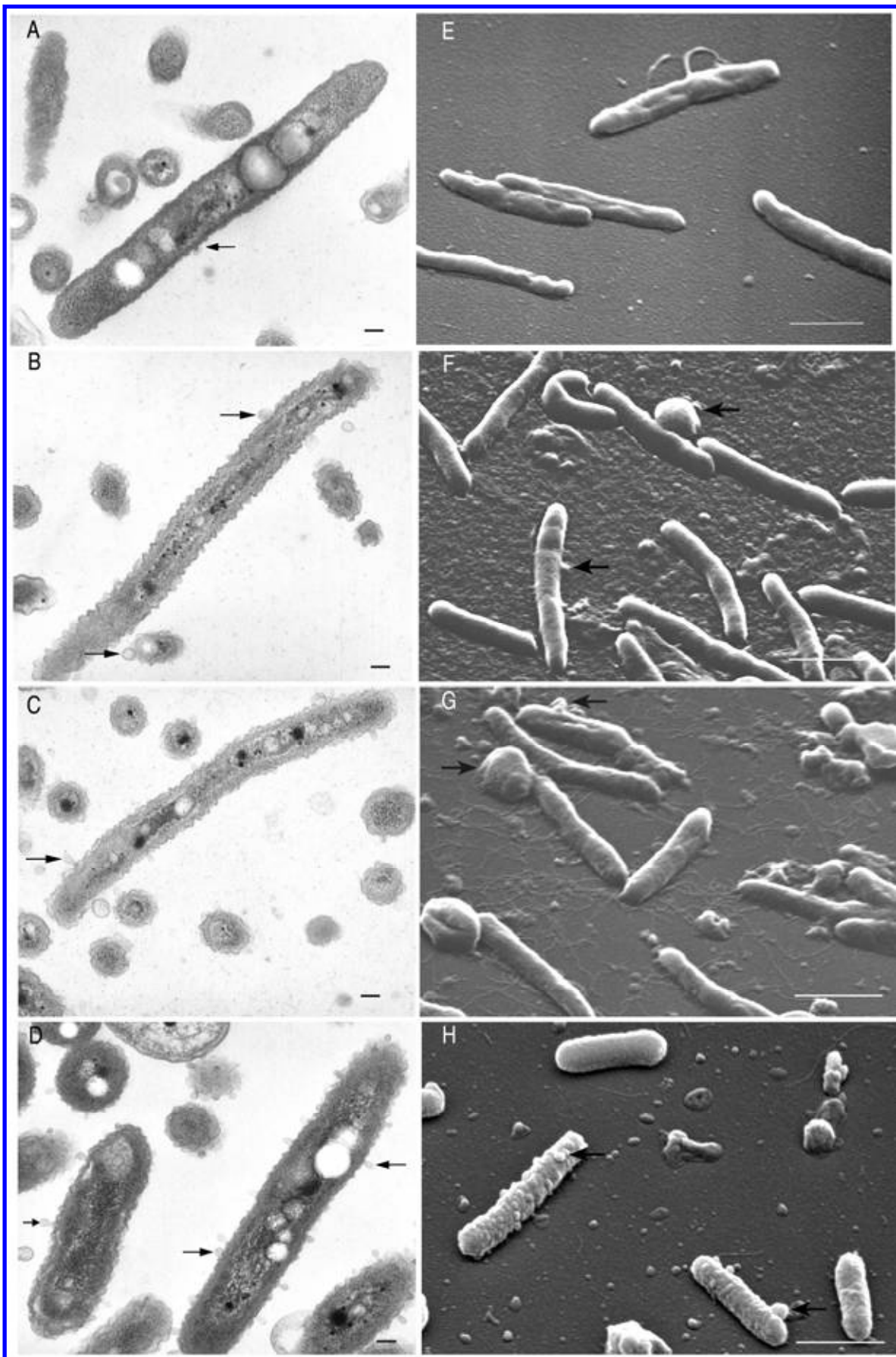


Fig. 2. Cells of *Xanthomonas albilineans* observed by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). **A** and **E**, XaFL07-1; **B** and **F**, M468; **C** and **G**, M768; **D** and **H**, M1152. Arrows indicate outer membrane vesicles. TEM bars = 100 nm (A to D) and SEM bars = 500 nm (E to H).

pRK-mopB restored SDS resistance to *X. albilineans* M468 but was unstable without selection.

mopB, cloned from *X. campestris* pv. *campestris* into wide host range (RepP) vector pRK415 (Chen et al. 2010), is 83% identical at the nucleotide level to XALc_0557. The predicted MopB protein includes both the OmpA OMC and C-like domains found in the predicted XALc_0557 homolog; therefore, pRK-mopB was expected to complement the XALc_0557 EZ-Tn5 mutations. DNA of pRK-mopB, extracted from *E. coli* DH5 α , proved difficult to directly transform by electroporation into any *X. albilineans* mutant strain. A helper plasmid, pPY0AAB27CH12 (Pieretti et al. 2009), carrying the methylation gene cluster from *X. albilineans* PC-73, was used in *E. coli* DH5 α to methylate pRK-mopB prior to electroporation into *X. albilineans*. Methylated pRK-mopB DNA extracted from *E. coli* carrying pPY0AAB27CH12 was electroporated with high transformation efficiency into M468. Provided that antibiotic selection pressure (i.e., tetracycline in the medium) was maintained, pRK-mopB in M468 restored resistance to SDS at 25 ppm.

However, when selection pressure was dropped and the *X. albilineans* cultures were allowed to grow for 7 days on solid MW medium and subsequently restreaked onto solid MW medium with tetracycline, no colonies grew, indicating that the plasmid was lost and that RepP plasmid pRK-mopB was unstable in *X. albilineans*. Not surprisingly, plants inoculated with M468 carrying pRK-mopB exhibited no complementation of pathogenicity over a 2-month period and no M468/pRK-mopB bacteria were recovered from inoculated plants (data not shown).

XALc_0557 cloned into pUFR047 was stable in *X. albilineans* without selection and restored resistance to SDS.

Full-length (1,101 bp) XALc_0557, including the native Shine-Dalgarno (SD) ribosomal binding site, was cloned into wide-host-range (RepW) vector pUFR047 (DeFeyer et al. 1993), resulting in pLF004.4. This construct was transformed into *E. coli*. DNA of pLF004.4 extracted from *E. coli* also proved difficult to directly transform by electroporation into any *X. albilineans* mutant strain. Again, pPY0AAB27CH12 was used to methylate pLF004.4 prior to electroporation into *X. albilineans* M468, which resulted in high transformation efficiencies.

Complementation using pLF004.4 was first evaluated by plating M468/pLF004.4 on MW medium amended with SDS, both with and without antibiotic selection for the plasmid. Resistance to SDS was restored, regardless of antibiotic supplementation, indicating that RepW vector pUFR047 was stable in *X. albilineans*.

pUFR047 was stable in *X. albilineans* in planta.

Plasmid pUFR047 stability in planta was more closely examined by inoculating sugarcane plants with wild-type strain XaFL07-1 carrying pUFR047, isolating the bacteria from the stalk as described, and comparing the population counts on selective medium with and without gentamycin. In all stalk colonization assays, no differences in cell counts were ever observed after a period of 2 months in planta, demonstrating that pUFR047 was stable in *X. albilineans* without selection.

Full-length XALc_0557 restores pathogenicity in M468.

Complementation of pathogenicity of M468 was examined in planta. Symptoms in sugarcane plants inoculated with M468 containing pLF004.4, although not quite as severe as the wild-type strain, were restored, and exhibited diagnostic pencil lines and necrosis typical of leaf scald disease (Fig. 3B).

XALc_0557 is required for *X. albilineans* endophytic stalk survival and stalk colonization.

Complementation of the defect in endophytic stalk colonization of M468 was also examined. M468 is unable to endophytically colonize sugarcane stalk tissue and was never recovered from inoculated stalks (Rott et al. 2011). To extend this work, survival in stalks of M468 and the complementing clone was examined in the present work. As previously observed, M468 was never recovered from inoculated sugarcane stalks. By contrast, M468/pLF004.4 not only survived but colonization was also restored; M468/pLF004.4 colonized sugarcane stalk tissue at population levels and to an extent nearly identical to that achieved by the wild-type strain: on a 0-to-100 scale, mean extent of stalk colonization (ESC) was 0 for M468 with empty vector pUFR047 and 88 for M468/pLF004.4, whereas mean ESC was 91 for wild-type XaFL07-1/pUFR047 (Fig. 4).

XALc_0557 assists *X. albilineans* epiphytic survival on leaves.

Leaves inoculated with XaFL07-1 by simple immersion were pressed onto agar plates 2 weeks after inoculation, resulting in a leaf impression on the agar surface and in growth of numerous colonies—sometimes even confluent growth—on selective medium. Colonies typically appeared in 10 to 100% of the imprint area (Fig. 5A and B). Imprints taken immediately after inoculation (day 0) exhibited confluent growth for all inoculated leaves because inoculum levels were high. Differences between strains (and leaves) only showed up with time; a 2-week assay delay was chosen to see survival differences between strains. Colony counts were taken and the mean extent of epiphytic survival (EES) of the wild-type strain reached values close to 50 (on a 0-to-100 scale). In contrast, imprinting of leaves inoculated with M468 resulted in growth of only a few colonies (Fig. 5C) and a mean EES value of 10 or less. Therefore, M468 appeared to have lost much of its capacity to survive on the sugarcane leaf surface. Epiphytic survival on leaf surfaces was restored by complementation using pLF004.4; M468/pLF004.4 colonized the surface of sugarcane leaves at population levels approaching those of the wild type (Fig. 5D).

XALc_0557 assists endophytic survival of *X. albilineans* in leaves and is required for pathogenic symptoms in leaves.

Levels of endophytic leaf survival and colonization were determined using at least 18 plants per mutant or wild-type strain inoculated using the decapitation method, which allows inoculum to be drawn into the xylem tissue of (usually up to five) inoculated leaves. Inoculations using the wild-type strain XaFL07-1 resulted in relatively consistent leaf colonization, with 28 of 33 leaves (85%) sampled on selective medium showing *X. albilineans* cell counts. Cell counts of the wild-type XaFL07-1 in leaf tissue sampled in this manner were 1.2×10^3 to 7.5×10^9 CFU/g (fresh weight) of macerated leaf tissue examined, for an average of 6.1×10^8 CFU/g of leaf tissue. In these leaves, including those with no cells counted in the sampled leaf area, the disease severity ranged from 4 to 6, and averaged 5.

By contrast with the wild-type strain, no mutant strain exhibited consistent leaf endophytic colonization; M468 was recovered from 6 of 33 leaves (18%) sampled, M768 was recovered from 7 of 25 leaves (28%) sampled, and M1152 was recovered from 2 of 33 leaves (6%) sampled. Surprisingly, cell counts of mutants M468 and M1152, which were never recovered from stalk tissue, were recovered from colonized leaves at relatively high population levels, ranging from 2×10^2 to 7.6×10^6 CFU/g of macerated leaf tissue examined, for an average population count of 9.8×10^5 CFU/g of leaf tissue. Polymerase chain reaction (PCR) was used to verify the mutant identity of

seven randomly chosen colonies of M468, M768, and M1152 recovered from these plants, and no revertants were detected (data not shown). Even in leaves with sampled cell counts of M468 as high as 7.6×10^6 CFU/g, no symptoms were observed up to 2 months postinoculation (i.e., the disease severity was 0 for all leaves inoculated with mutants). These results indicated that the endophytic stalk environment may be harsher for *X. albilineans* than the endophytic leaf environment, or that the mutants are deficient in the ability to efficiently move in leaves. These results also indicated that, although some sugarcane leaves provided an environment that allowed endophytic colonization of M468 and M1152, the bacteria did not cause disease and, therefore, required XALc_0557 not just for stalk colonization but also to condition disease symptoms.

M468 transformed with pLF004.4 was recovered from five of seven leaves (71%) sampled at populations of 3×10^3 to 1.5×10^6 CFU/g of tissue. Disease severity in leaves from these plants was 1 to 5, with an average of 4. Complementation restored ability of M468 to more consistently survive and grow endophytically in leaf tissue, and also restored ability of M468/pLF004.4 to cause disease, even at low population levels.

The OmpA C-like domain of XALc_0557 complements the full range of mutant phenotypes of M1152 but only SDS resistance in M468.

Plasmid pCT47.3 was constructed in an attempt to express only the C-like domain for the purpose of complementation (Fig. 1). The 3' end of XALc_0557 from the wild-type strain

was cloned using primers with an added canonical SD sequence (AGGAG) and methionine start site into pUFR047, forming pCT47.3. This plasmid restored resistance to SDS to both M468 and M1152. Restoration of SDS resistance in M468, with an insertion mutation that eliminates both the OMC and C-like domains, indicated that the C-like domain alone is important for stabilizing at least the barrier function of the OM. pCT47.3 also restored moderate levels of pathogenicity, stalk colonization, and leaf colonization to M1152 but not M468 (Fig. 3E). M1152 transformed with pCT47.3 was recovered from two of eight leaves at populations of 7.9×10^3 to 8.2×10^3 CFU/g of tissue. Disease severity in leaves from these plants was 1 to 4, with an average of 2.7. These results indicated that both the OMC and C-like domains were needed for full pathogenicity and for stalk colonization. These results also indicated that the two domains formed modules capable of independent function.

Regions downstream of the EZ-Tn5 insertions were transcriptionally active and complementation constructs restored transcription to wild-type levels.

Using FindTerm (energy threshold of -10 ; default is -11), a weak Rho-independent terminator was found in Tn5 but no transcriptional terminators were found in EZ-Tn5, using either ARNold or FindTerm. Expression of the XALc_0557 coding sequences corresponding to the OMC and C-like regions from the wild-type strain, M468, M468/pCT47.3, M468/pLF004.4, and M768 were examined to determine expression levels up-

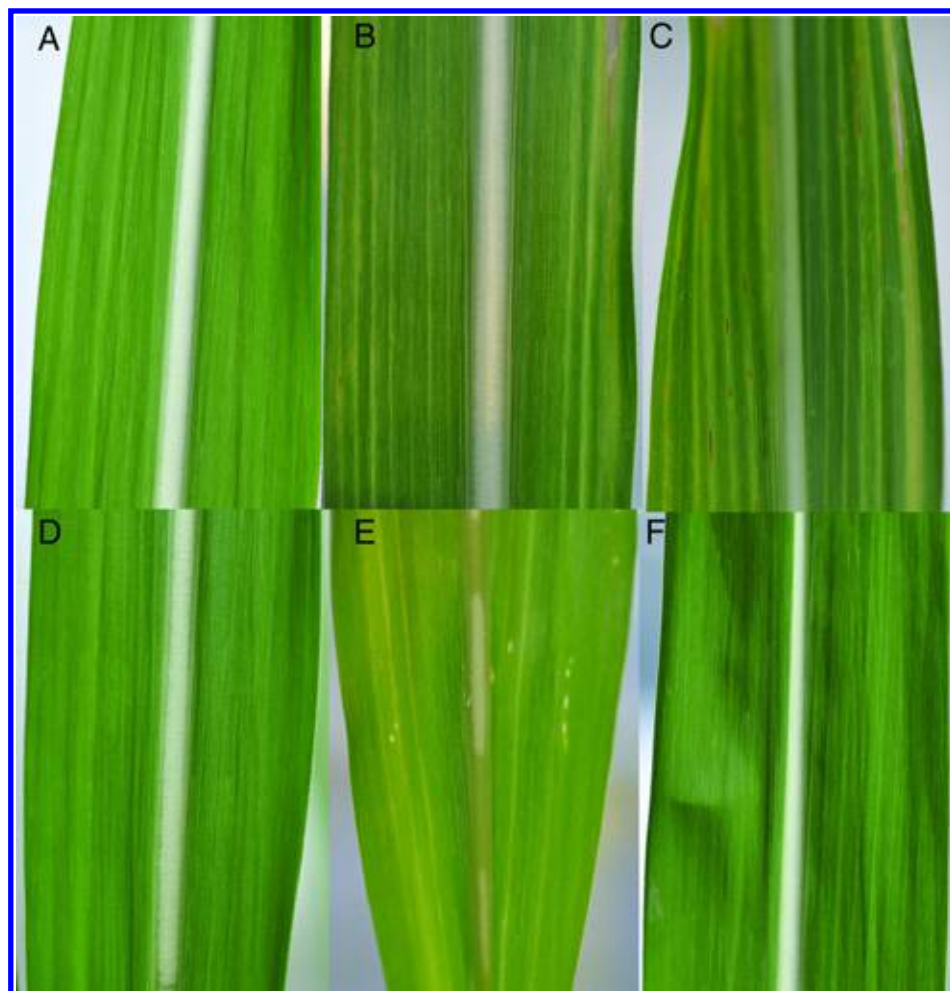


Fig. 3. Complementation of XALc_0557 EZ-Tn5 mutations affecting pathogenicity on sugarcane 'CP80-1743'. A, M468/pUFR047; B, M468/pLF004.4; C, XaFL07-1/pUFR047; D, M1152/pUFR047; E, M1152/pCT47.3; F, H₂O.

stream and downstream of the EZ-Tn5 insertion sites (Fig. 1) by reverse-transcriptase quantitative (RT-q)PCR. The relative abundance of transcripts (ΔC_q) from the C-like region was approximately half that of the N-terminal region in the wild-type strain (data not shown), which is consistent with the 3' to 5' directionality of mRNA decay of *ompA* in *E. coli* (von Gabain et al. 1983). The $\Delta\Delta C_q$ or relative normalized expression method was used to calculate the relative expression of the N-terminal and C-terminal regions; results are presented in Supplementary Fig. S2. The N-terminal region was stably and consistently expressed in all samples. Transcription downstream of EZ-Tn5 was detected in both M468 and M768. The relative normalized expression of the C-like domain in M468 was 15-fold less than in the wild type (P value = 0.003) but, in M768, it was only 3-fold less than in the wild type (P value = 0.016). The expression level of the C-terminal region in M468 carrying either the C-terminal or full-length complementation constructs was restored to the same levels as the wild-type strain (P value = 0.760 and 0.650, respectively).

M768 likely formed a translational fusion that functionally separated the two OmpA1 domains.

Examination of the EZ-Tn5 transposon insertion site in M768 revealed a potential SD ribosomal binding site [AGG(G)] beginning at the 1,196th base of the EZ-Tn5 sequence and an ATG start site 6 bp immediately downstream of the potential SD, which would form an in-frame translational fusion with the XALc_0557 open reading frame (ORF) at the site of the M768 insertion (Supplementary Fig. S3). Because no transcriptional terminator was predicted to be downstream from the *kan2* gene on the transposon, the Kan-2 promoter of EZ-Tn5 could drive a translational gene fusion. This predicted gene fusion included the entire C-like domain of XALc_0557, adding six amino acids from the transposon to the N-terminus of the XALc_0557 native sequence, and functionally separating the OMC domain from the C-like domain. Levels of expression of

the C-like domain of the predicted translational fusion were threefold lower than that of the wild type.

DISCUSSION

OmpA of *E. coli*, the archetypical integral OM protein, has been called a molecular Swiss army knife (Smith et al. 2007). Consistent with that characterization of multifunctionality, the present study shows that XALc_0557 plays a central role in *X. albilineans* OM integrity, epiphytic survival, endophytic survival, and pathogenicity. Mutations affecting the OM proteins of several gram-negative bacterial plant pathogens have been shown to compromise the critically important barrier function of OM proteins and allow host defense compounds, including phytoalexins or reactive oxygen species, to be much more effective against bacteria suffering these mutations (Balsanelli et al. 2010; Kingsley et al. 1993). XALc_0557 knockout mutants M468 and M1152 were never recovered from inoculated sugarcane stalks, and both mutants exhibited greater sensitivity to SDS, which strongly indicated that the barrier function of the OM was severely compromised, at least in these mutants; which, in turn, likely affected both epiphytic and endophytic survival in planta.

The phenotypes of mutant M768, particularly the inconsistent low level of pathogenicity and stalk colonization as compared with four other EZ-Tn5 insertions in the same locus (Rott et al. 2011), were at first puzzling. Transposon insertions are generally considered to be polar, although there have been exceptions reported with Tn5 (de Bruijn and Lupski 1984). In terms of a gene encoding two predicted domains, a Tn5 insertion should eliminate transcriptional read-through to the downstream portion of the affected gene. However, M768 exhibited transcriptional read-through and the downstream region was clearly expressed, although expression was diminished. The phenotypes of M768 were similar to those of M1152/pCT47.3, except that pathogenicity and stalk colonization of M768 were much weaker, indicating that the translationally fused C-like domain in M768 was expressed at a much lower level than the same domain in pCT47.3, expressed in M1152. Together, the

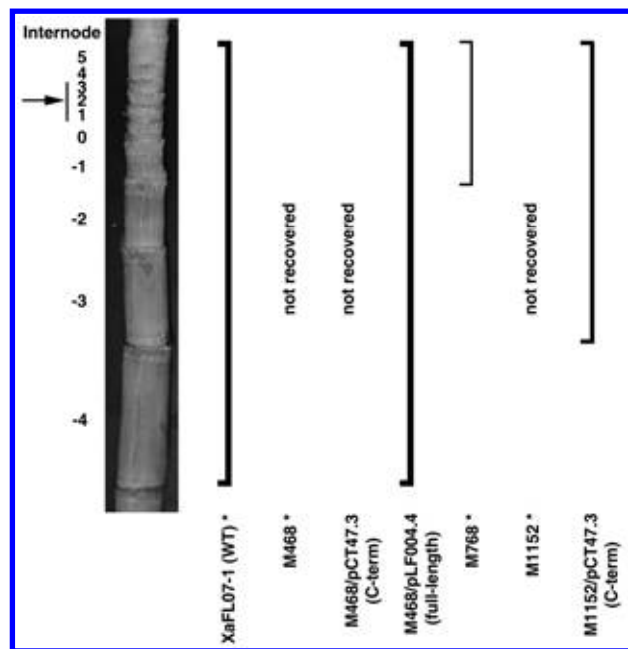


Fig. 4. Stalk colonization of *Xanthomonas albilineans* wild-type, mutant, and complemented strains. Strains were recovered from a minimum of eight sugarcane stalks, all inoculated as described (arrow indicates the region of attachment of the inoculated leaves) and at similar initial cell densities (5×10^8 CFU/ml). Bracket thickness (width) corresponds to cell density recovered 2 months postinoculation from the indicated stalk region; * indicates strain carries empty vector pUFR047.

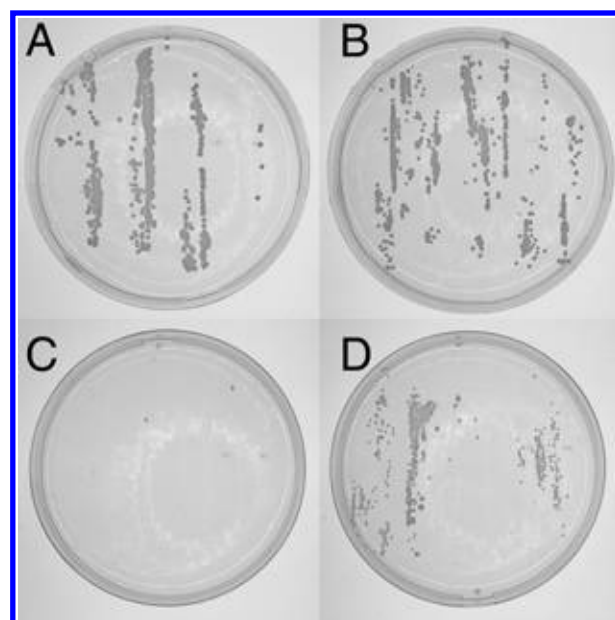


Fig. 5. Growth of *Xanthomonas albilineans* on selective medium after imprinting of sugarcane leaves (upper and lower surfaces). Growth shown 2 weeks after immersion of the leaves in a suspension of *X. albilineans* (1×10^7 CFU/ml). A, XaFL07-1 (wild-type); B, XaFL07-1/pUFR047; C, M468; D, M468/pLF004.4.

phenotypes of M768 and M1152/pCT47.3 (SDS resistance, stalk colonization, and ability to cause symptoms of leaf scald) support the idea that both the OMC and OmpA C-like domains of XALc_0557 are needed for pathogenicity and stalk colonization by *X. albilineans* and that both domains can function independently of each other.

The intact OmpA C-like domain appeared to be required for robust growth on SDS media. Both pLF004.4 and pCT47.3 restored SDS resistance to M468. M468 carries a Tn5 insertion in the upstream OMC domain that virtually abolished expression of the OmpA C-like domain. Because pCT47.3 restored SDS resistance to M468 and encoded only the OmpA C-like domain of XALc_0557, it appears that the OmpA C-like domain of XALc_0557 alone was responsible for restoring SDS resistance, likely by stabilizing the OM. Despite the overall appearance by TEM of the M1152 cells being more similar to the wild type (compare Fig. 2A with D) than to the other two mutants, the disrupted portion of the C-like domain in M1152 may destabilize the predicted periplasmic anchoring of the OM to the bacterial cell wall. In addition to a defensive role, XALc_0557 also appeared to play a role in pathogenic offense. Surprisingly, and despite the fact that knockout mutants M468 and M1152 were never recovered from stalk tissues, endophytic leaf populations of M468 and M1152 mutants were sometimes recovered at levels similar to those observed with the wild-type strain. Nevertheless, the inoculated leaves that retained endophytic *X. albilineans* mutant bacteria remained completely asymptomatic. The mutants were unable to cause the characteristic pencil-line streaks and chlorosis in leaf tissue caused by the wild type, despite their ability to produce albidin when grown on agar plates (Rott et al. 2011).

Mutants M468 and M768 produced more and much bigger OMV than the wild type, and M1152 hyperproduced OMV (at least 10× more) when compared with the other two mutants. M1152 may be hypervesiculating due to the greater abundance of misfolded OmpA1 in the OM. When misfolded or toxic levels of proteins accumulate in the OM proteins of bacteria, the result can be production of OMV that package these proteins so that they are removed from the cell (McBroom and Kuehn 2007). M768 produced less of the C-terminal region than the wild type because its expression was driven off of the Tn5 transposon and translation was dependent on a predicted weaker SD sequence (AGG) than that of XALc_0557 (AAGGAG). In addition, the two expressed (OMC and C-like) domains would be physically unlinked. By contrast, M1152, with a predicted truncated C-like region, would likely have levels of expression of the C-like region equivalent to that of the wild type but the mutant C-like domain would be physically linked to the OMC region. Consequently, M1152 should produce abundant misfolded OmpA1, while M768 produced both domains intact but physically separated.

XALc_0557 proved difficult to clone in high copy vectors allowing expression in *E. coli*, in line with multiple reports of such difficulties (see above). More than 30 PCR amplicons from this locus, most created using *Taq* polymerase with proof-reading activity, were TA-cloned in pCR2.1-TOPO (high copy in *E. coli*) and sequenced; all of them had one or more mutations affecting the predicted coding sequence (data not shown). In order to achieve a functional full-length clone, domains containing errors were swapped with error-free fragments and cloned directionally in order to avoid expression of XALc_0557. The final clone was directionally recloned to allow expression in a vector (pUFR047, repW) that replicates at low-moderate copy in *E. coli* (DeFeyter et al. 1990). The resulting *E. coli* strains carrying XALc_0557 appeared to grow normally. Notably, a low-copy vector was also used in the work reported by Chen and associates (2010).

The mechanism by which XALc_0557 in *X. albilineans* plays an offensive role in pathogenicity remains speculative. The fact that wild-type *X. albilineans* cells produce vesicles (Fig. 2A and E) indicates a potential secretion mechanism that has not previously been reported for *X. albilineans* but has for *X. campestris* pv. *campestris* (Sidhu et al. 2008). Indeed, OMV appear to be produced by all gram-negative bacteria examined to date and comprise budded, released spheres of OM surrounding periplasmic content that can include signaling and virulence compounds, including toxins (Schwechheimer et al. 2013). It is possible that XALc_0557 may indirectly affect the efficiency of albidin export and secretion from *X. albilineans* cells in planta, because loss of OM integrity may, in turn, cause misassembly or loss of function of the albidin efflux pump (Pieretti et al. 2009). Alternatively or in addition, XALc_0557 may play a role in attachment of *X. albilineans* to sugarcane leaf surfaces as a first step in colonization or invasion, as suggested by Chen and associates (2010) for *X. campestris* pv. *campestris* and Bruening and associates (2003) for *Xylella fastidiosa*. *Xanthomonas albilineans* is aerielly transmitted (Daugrois et al. 2003), which presumably involves the need for attachment, and OmpA1 mutant M468 proved to be deficient in survival on sugarcane leaves. The hypervesiculation observed with all XALc_0557 mutants examined indicates that OmpA1 of *X. albilineans* plays a key role in vesicle production or stability that deserves closer examination in terms of conditioning pathogenicity.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions.

All strains and constructs used are summarized in Table 1. *X. albilineans* XaFL07-1, isolated in 2007 from sugarcane sampled in Canal Point, FL, was used in all experiments. XALc_0557 mutants 468, 768, and 1152 were created by electroporation of XaFL07-1 with 20 ng of the transposase-EZ-Tn5 DNA synaptic complex (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, U.S.A), and previously reported by Rott and associates (2011). Bacteria were routinely cultured on MW medium (10 g of sucrose, 5 g of peptone, 0.50 g of $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.25 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 g of Na_2SO_3 , 15 g of agar, and 1 liter of deionized water, pH 6.8 to 7.0) at 28 to 30°C. EZ-Tn5 insertion mutants were grown on MW agar supplemented with kanamycin at 20 mg/liter. All strains were stored at -80°C as turbid cell suspensions in sterile distilled water.

E. coli strains Mach1, TOP10, and DH5 α were grown in Luria Broth (LB) (Sambrook et al. 1989) or PYGM (5 g of peptone, 3 g of yeast extract, 40 ml of 50% glycerol, and 15 g of agar in 900 ml of deionized water, pH 7.4; after autoclaving, 100 ml of morpholinepropanesulfonic acid buffer was added) (Defeyter et al. 1990) at 37°C. Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin, 40 μ g/ml; kanamycin, 50 μ g/ml; tetracycline, 10 μ g/ml; chloramphenicol, 25 μ g/ml; and gentamycin, 3 μ g/ml. Chemically competent *E. coli* was transformed using 10 to 150 ng of DNA in 50 μ l of cells. After adding DNA, cells were incubated for 10 min on ice and were heat shocked at 42°C for 30 s, and 250 μ l of room-temperature SOC medium (Sambrook et al. 1989) was immediately added. The mixture was then incubated at 37°C for 1 h and plated on appropriate selective media.

Electrocompetent *X. albilineans*.

Liquid cultures of XALc_0557 mutants or the wild type in a total volume of 25 ml MW medium were grown at 28°C for 2 to 3 days (to an optical density at 600 nm [OD₆₀₀] = 0.4 to 0.7) with shaking at 125 rpm in a rotary water bath shaker. Cultures were chilled in ice water for 15 to 30 min and centrifuged at 4°C

at 3,200 × g for 15 min. Cells were gently washed first in 50 and then in 25 ml of ice-cold distilled water and centrifuged at 4°C at 3,200 × g for 15 min. Pellets were resuspended in 1 ml of sterile distilled water and stored as 50-µl aliquots at –80°C.

Electroporation of *X. albilineans*.

Electrocompetent *X. albilineans* cells were thawed on ice. Plasmid DNA or ligation mixes (1 to 5 µl or approximately 50 to 150 ng) were added to prechilled cuvettes with 1-mm gaps and put on ice. Competent cells (40 µl) were pipetted into the cuvettes and incubated on ice for 30 s. Cells were electroporated at 1,800 kV using an Eppendorf 2510 electroporator (Westbury, NY, U.S.A.). Typically, time constants were between 5.6 and 6.2. Immediately after electroporation, 900 µl of MW medium was added and cells were transferred to 14-ml Falcon tubes and allowed to recover at 28°C for 3 to 4 h. Transformed cells were plated on MW medium with appropriate antibiotics.

Verification of EZ-Tn5 Stability in M768.

Colony touch PCR of M768 was performed directly from cells growing on media containing SDS to verify that this strain was not a revertant and the transposon was still intact. Three different primer sets were used: i) Kan2FP (5' ACC TAC AAC AAA GCT CTC ATC AAC C 3') + ompAR1 (5' AAA GCT TCA CTT GTT CTC GAC GTT CAG 3'), ii) Kan2RP (5' GCA ATG TAA CAT CAG AGA TTT TGA G 3') + ompAF2 (5' AGG ATC CAA CCG ATG CCA CCA CGG AC 3'), and iii) ompAF2 + ompAR1. Using M768 as PCR substrate, primer set 1 should amplify a 437-bp band, set 2 a 1,379-bp band, and set 3 a 2,884-bp band. The wild-type strain should not be amplified by primer sets 1 or 2, and should display a 1,663-bp amplicon with primer set 3.

Construction of pLF004.4.

A 1,156-bp fragment comprising the full-length XALc_0557 predicted ORF, annotated as *X. albilineans ompA1* and including the native SD region, was amplified by PCR from strain XaFL07-1. Accuprime *Taq* High Fidelity polymerase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, U.S.A.), 2× Failsafe Buffer D (Epicentre), primer ompAF1 (5' CGG ATC CTG CCT CTA TCG TTT TAT CTC 3') with an added *Bam*HI site, and ompA R1 (5' AAA GCT TCA CTT GTT CTC GAC GTT CAG 3') with an added *Hind*III site were used. PCR products were cloned

into pCR2.1-TOPO (Invitrogen) and transformed into *E. coli* Mach 1 cells. Plasmid DNA was extracted and sequenced, resulting in pLF003. The plasmid was digested sequentially with *Bam*HI and *Hind*III and the resulting fragment was gel purified and ligated into broad-host-range, repW shuttle vector pUFR047 (DeFeyer et al. 1993), resulting in plasmid pLF004.4.

Construction of pCT47.3.

A 351-bp fragment corresponding to the C-Terminal OmpA C-like domain of XALc_0557 was amplified by PCR from XaFL07-1 using Accuprime *Taq* High Fidelity polymerase (Invitrogen), 2× Failsafe Buffer D (Epicentre), primer CTermF (5' TG AAT TCA GGA GTC TAG ATG CTG AAG GGT GTC AAC TTT GAC TTC 3') with an added *Eco*RI site and SD sequence, and primer CTermR (5' TTA AGC TTA TCA CTT GTT CTC GAC GTT CAG CT 3') with an added *Hind*III site. The PCR product was digested with *Eco*RI and *Hind*III and the resulting fragment was gel purified and ligated into pUFR047 and directly transformed into electrocompetent XALc_0557 M1152. Ten colonies were obtained. All colonies were screened using several primer sets to verify the presence of the gene within the vector. In all, 7 of the 10 colonies were PCR positive. Four of the seven colonies were inoculated in 10-ml liquid cultures in MW medium and grown for 3 days, and plasmids were extracted and sequenced. Only one plasmid extracted from colony 3 had a sequence that was 100% identical to the expected XALc_0557 sequence, and this construct was given the name pCT47.3.

Methylation of pLF004.4 and pRK-mopB.

E. coli DH5α containing pPY0AAB27CH12, a plasmid containing the methyltransferase gene XALc_2634 from *X. albilineans* PC73 (Champoiseau et al. 2006b; Pieretti et al; 2009), was inoculated into 1 ml of LB broth supplemented with chloramphenicol. Cells were cultured at 37°C for 16 h. A 50-µl aliquot was inoculated in 10 ml of LB supplemented with chloramphenicol and incubated at 37°C for 2 h. Cells were transferred to a 40-ml Oakridge tube and pelleted at room temperature. The cell pellet was resuspended in 700 µl of cold 0.1 M CaCl₂ solution, and 200-µl aliquots of cells were transferred to four sterile 16-by-100-mm glass tubes and placed on ice. Approximately 250 ng of plasmid DNA (pLF004.4 or pRK-mopB) was added to the cells and incubated on ice for 20 min. Tubes were trans-

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain	Relevant characteristics ^a	Reference or source ^b
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5α	F [–] , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk [–] ,mk ⁺), <i>supE44</i> , <i>λ-thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>Φ80lacZΔM15</i> , <i>Δ(lacZYA-argF)U169</i> , <i>phoA</i>	Invitrogen Corp.
<i>E. coli</i> Mach1-T1 ^R	F [–] , <i>Φ80lacZΔM15</i> , <i>ΔlacX74</i> , <i>hsdR</i> (rk [–] ,mk ⁺), <i>ΔrecA1398</i> , <i>endA1</i> , <i>tonA</i> (confers resistance to phage T1)	Invitrogen Corp.
<i>E. coli</i> TOP10	F [–] , <i>mcrA</i> , <i>Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> , <i>Φ80lacZΔM15</i> , <i>ΔlacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , <i>Δ(ara leu) 7697</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>StrR</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen Corp.
XaFL07-1	<i>Xanthomonas albilineans</i> , wild-type strain isolated in Florida	Rott et al. 2011
M468	Nonpathogenic Tn5 mutant derivative of XaFL07-1; XALc_0557::EZ-Tn5, Kn ^r	Rott et al. 2011
M768	Nonpathogenic Tn5 mutant derivative of XaFL07-1; XALc_0557::EZ-Tn5, Kn ^r	Rott et al. 2011
M1152	Nonpathogenic Tn5 mutant derivative of XaFL07-1; XALc_0557::EZ-Tn5, Kn ^r	Rott et al. 2011
Plasmids		
pPY0AAB27CH12	10.6-kb region from <i>X. albilineans</i> strain PC73 containing XALc_2634 (methyltransferase) cloned into pCNS, Cm ^r	Pieretti et al. 2009
pCR2.1-TOPO	3.9 kb; PCR cloning vector, Amp ^r , Kn ^r	Invitrogen Corporation
pUFR047	8.6 kb; IncW, Mob ⁺ , <i>lacZα</i> ⁺ , Par ⁺ , Gm ^r , Amp ^r	DeFeyer et al. 1993
pLF003	5.0 kb; 1.1-kb region containing XALc_557 of XaFL07-1 cloned into pCR2.1-TOPO, Amp ^r , Kn ^r	This work
pLF004.4	9.7 kb; 1.1-kb <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III fragment containing XALc_0557 from pLF003 cloned into pUFR047, Gm ^r , Amp ^r	This work
pCT47.3	8.9 kb; 351bp <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III fragment containing the C-terminal OmpA domain of XALc_0557 of XaFL07-1 cloned into pUFR047, Gm ^r , Amp ^r	This work
pRK-mopB	11.7 kb; 1.1-kb region containing mopB of <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> cloned into pRK415, Tet ^r	Chen et al. 2011

^a Amp = ampicillin, Gm = gentamicin, Kn = kanamycin, St = streptomycin, and Tet = tetracycline. PCR = polymerase chain reaction.

^b Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, U.S.A.

ferred to 42°C for 1 min and incubated on ice for an additional 10 min. A volume of 1.8 ml of LB medium was added to each tube and cells were incubated without shaking at 37°C for 2 h. Aliquots of 100 µl were plated on PYGM agar supplemented with gentamycin and chloramphenicol. Methylation was verified by comparing the *HincII* restriction profile of methylated and unmethylated pLF004.4 or pRK-mopB extracts.

SDS tolerance assay.

MW agar medium was prepared as described above and autoclaved, and 10% filtered SDS in water was added to a final concentration of 25 ppm. *X. albilineans* wild-type and mutant cultures (2 to 3 days old) were streaked onto these plates and incubated at 30°C for 4 days, and relative growth was compared.

Epiphytic survival bioassay.

Tissue-cultured plantlets of CP68-1026 sugarcane exhibiting two to three fully expanded leaves were immersed for 5 s in a suspension of *X. albilineans* at 10^7 CFU/ml of distilled sterile water. After immersion, plantlets were placed in 200-by-20-mm test tubes containing nutritive plant growth medium (Rott and Chagvardieff 1984), and incubated in a growth chamber at 28°C with 12 h of light. Two weeks after inoculation, the upper and lower surfaces of leaves were imprinted on WSD selective medium (Davis et al. 1994). The plates were examined for the presence or absence of bacterial colonies of *X. albilineans* after 5 days of incubation at 28°C.

Epiphytic survival was estimated by using a scale of 0 to 6, where 0 = no colonies in the leaf imprint, 1 = 1 to 50 colonies in the leaf imprint, 2 = more than 50 colonies and no confluent growth of bacteria in the leaf imprint, 3 = confluent growth of bacteria in less than 10% of the leaf imprint, 4 = confluent growth of bacteria in 10 to 40% of the leaf imprint, 5 = confluent growth of bacteria in 41 to 80% of the leaf imprint, and 6 = confluent growth of bacteria in 81 to 100% of the leaf imprint. EES was expressed as $EES = 100 [(1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4 + 5 \times N_5 + 6 \times N_6)/6 \times N_T]$, where N_i = number of the leaf surfaces with score i and N_T = total number of leaf surfaces per plantlet.

Plantlets were inoculated with wild-type strain XaFL07-1, XALc_0557 mutant M468, M468/pLF004.4, and sterile distilled water as control. Six plantlets were inoculated per strain and randomly distributed in the growth chamber. The experiment was repeated independently once.

Inoculation of sugarcane by decapitation.

Suspensions of *X. albilineans* strains to be tested for pathogenicity were standardized to $OD_{600} = 0.30 \pm 0.02$ in sterile distilled water. Sugarcane CP80-1743 with at least three developed stalk internodes was inoculated with approximately 300 to 600 µl of *X. albilineans* cell suspension by the decapitation method as described (Rott et al. 1997), in greenhouse conditions. Briefly, leaves that had developed sufficiently to expose the dewlaps were numbered from the top of the stalk downward and the tightly whorled leaf region between the third and fourth dewlaps, which usually included leaves attached to newly formed stalk nodes, was cut through with sterile pruning shears. The *X. albilineans* cell suspension was then applied with a pipette to the cut leaf surface, and the suspension was naturally drawn into the xylem. In each inoculation experiment, at least eight plants were inoculated with each strain or water (as a control).

Symptom assessments.

One month postinoculation, visual observations of qualitatively assessed leaf symptoms were recorded for at least three emerging leaves per plant. The symptoms, expressed as dis-

ease severity on a scale of 0 to 6, were scored as follows: 0 = no symptoms, 1 = one to five pencil lines, 2 = six to ten pencil lines, 3 = more than 10 pencil lines, 4 = leaf chlorosis or less than 10% necrosis, 5 = 10 to 50% leaf necrosis, and 6 = more than 50% necrosis.

Assessment of leaf colonization.

One month postinoculation, leaves were sampled using scissors sterilized with 95% ethanol. Leaves were cut with a scalpel into approximately 2-in. sections and weighed. Leaf tissue was sterilized by brief submersion in 95% ethanol and flaming. Sterilized leaf tissue was then chopped into small pieces using a sterile scalpel and forceps in plastic petri dishes and 1 ml of Tris-buffered saline buffer was pipetted onto the chopped leaf fragments. After 2 h of incubation at room temperature, homogenates were serially diluted and plated in triplicate on MW medium supplemented with cephalixin at 25 mg/liter, novobiocin at 30 mg/liter, cycloheximide at 50 mg/liter, and benomyl at 12.5 mg/liter (WCNCB medium) (Rott et al. 2011) and MW medium supplemented with kanamycin at 20 mg/liter, novobiocin at 30 mg/liter, cycloheximide at 50 mg/liter, and benomyl at 12.5 mg/liter (WKNCB medium) (Rott et al. 2011). Plates were incubated for 3 to 5 days at 30°C.

Assessment of stalk colonization.

Two months postinoculation, leaves were removed and stalks were cut at the soil level by sterile pruning shears. The rind of the stalk was cleaned with 95% ethanol and paper towels. It was sprayed again with 95% ethanol and flame sterilized. Using sterilized pruning shears, the stalk was cut in between nodes and the cut section was pressed onto WCNCB and WKNCB for Tn5 mutants or MW medium supplemented with gentamycin at 3 mg/liter, novobiocin at 30 mg/liter, cycloheximide at 50 mg/liter, and benomyl at 12.5 mg/liter (WGNCB) for plasmid constructs with gentamycin resistance or MW medium supplemented with tetracycline at 10 mg/liter, novobiocin at 30 mg/liter, cycloheximide at 50 mg/liter, and benomyl at 12.5 mg/liter (WTNCB) for plasmid constructs with tetracycline resistance. Stalk colonization was assessed in 10 locations: I – 4 (representing four internodes below the first stunted internode) through I + 5 (representing five internodes above the first stunted internode, called I0). Stalk colonization was quantified with the following scoring system: 0 = no bacterial colony in the stalk imprint, 1 = 1 to 10 colonies in the stalk imprint, 2 = more than 10 colonies or confluent growth of bacteria in less than 25% of the stalk imprint, 3 = confluent growth of bacteria in 25 to 75% of the stalk imprint, and 4 = confluent growth of bacteria in more than 75% of the stalk imprint. ESC was expressed as $ESC = 100 [(1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4)/4 \times N_T]$, where N_i = number of internodes with score i and N_T = total number of internodes.

TEM.

Bacteria that grew for 2 to 3 days on Wilbrink's medium were fixed in a 4% glutaraldehyde and 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated using a series of acetone washes, and embedded in TAAB 812 epon resin. Ultrathin sections (60 nm) were mounted on collodion carbon-coated copper grids, contrasted using uranyl acetate and lead citrate, and examined at 80 kV with a transmission electron microscope (Jeol 100CX II).

SEM.

Bacteria that grew for 2 to 3 days on Wilbrink's medium were deposited upon a polylysine coated cover glass and fixed with 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer, pH 7.2, for 2 h at room temperature. Bacteria were then washed in cacodylate

buffer and fixed samples were dehydrated using a graded ethanol series (30 to 100%), followed by 2 min in hexamethyldisilazane. Subsequently, the samples were coated with an approximately 10-nm-thick gold film and examined with a scanning electron microscope (Hitachi S4000).

DNA sequence analysis.

ORF were predicted using pDRAW32 by AcaClone Software. Conserved OmpA domains were identified using BLASTp, and homologues of *X. albilineans ompA1* were identified using the BLASTn algorithms from the National Center for Biotechnology Information.

Transcription terminator analysis of EZ-Tn5 and Tn5.

The DNA sequences of EZ-Tn5 and Tn5 were obtained from Epicentre and GenBank, respectively. Web-based transcriptional terminator analysis sites ARNold and FindTerm, available from Softberry (Mount Kisco, NY, U.S.A.) were used with default settings. In the case of FindTerm, the default energy threshold setting was adjusted higher to allow detection of weaker terminators.

Extraction of RNA, DNase treatment, and cDNA synthesis.

X. albilineans strains were inoculated into liquid MW media supplemented with appropriate antibiotics and grown until early log stage ($OD_{600} = 0.15 \pm 0.02$). Starter cultures were transferred to fresh media and grown until reaching $OD_{600} = 0.30 \pm 0.10$. RNA was immediately stabilized by the addition of 2 ml of RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.) to 1 ml of culture. The mixture was vortexed for 5 s, incubated at room temperature for 5 min, and centrifuged at $3,700 \times g$ for 15 min. The supernatant was poured off and RNA was extracted using the RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) Protocol 4 (Enzymatic Lysis and Proteinase K Digestion of Bacteria) followed by Protocol 7 (Purification of Total RNA from Bacterial Lysate Using the RNeasy Mini Kit). All extracts were analyzed for yield and purity using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, U.S.A.). The A_{260}/A_{280} (absorbance) values of samples were 2.06 to 2.12 and the A_{260}/A_{230} values were greater than 0.17, indicating that extracts were relatively free of protein contaminants. No RT controls in initial experiments revealed significant DNA contamination of RNA extracts. RNA extracts were diluted in nuclease-free water to 120 ng/ μ l, and contaminating DNA in RNA extracts was removed by treatment with TURBO DNA-free Kit (Ambion, Austin, TX, U.S.A.) according to the manufacturer's protocol for "rigorous DNase treatment", and RNA was reverse transcribed using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen).

Real-Time PCR.

The expression of the mRNA corresponding to the N-terminal OM-channels domain was assayed using the primer set Omp-ANtermF (5' CTG GTT TCA ATT TCC AGG ACG 3') + Omp-ANtermR (5' GTT CGG GTT CTG ATA GTT CAG 3'), which amplified a 125-bp fragment upstream of all EZ-Tn5 insertion sites. The expression of the mRNA corresponding to the C-terminal OmpA C-like domain was assayed using primer set Omp-ACtermF (5' CAA CTT TGA CTT CAA CAA GTC G 3') + Omp-ACtermR (5' TTG TCG CTA CCG ATG GAG TC 3'), which amplified a 135-bp fragment between the insertion sites of M768 and M1152. The specificity of the two primer sets was initially assessed by conventional PCR. RT-qPCR reactions were carried out using the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.). The reaction mixture contained 10 μ l of 2 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 25 ng of cDNA, and 300 nM each primer in a

total volume of 20 μ l. Reactions were incubated at 95°C for 15 min, and cycled 40 times at 94°C for 15 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s. Standard curves were prepared to calculate the amplification efficiencies for the two primer sets across a linear dynamic range of six \log_{10} concentrations, with $r^2 = 0.990$ and 0.993 for the N-terminal and C-terminal primer sets, respectively. Melting curve analyses were performed to assess the specificity of the products. Three technical replicates were performed for each of two biological replicates, along with no-RT controls (NRTC) and no-template controls (NTC) for each strain and primer set. Of 74 NRTC runs, only 3 amplified, with Cq values of 38.93, 34.76, and 37.29. The mean Cq values of the corresponding samples were 14.50, 14.56, and 14.97, respectively, indicating that the levels of DNA contamination were negligible. All NTC runs failed to amplify. Relative normalized expression levels were calculated with the Bio-Rad CFX Manager Software Package 3.0. A correction factor to account for the difference in amplification efficiencies between the N-terminal and C-terminal primer sets was applied and the wild-type strain was set as a control, with relative expression level set to 1. Student's *t* tests ($\alpha = 0.05$) were performed using the Bio-Rad CFX Manager Software Package 3.0.

ACKNOWLEDGMENTS

P. Rott and this work were supported by a Marie Curie Outgoing International Fellowship from the European Commission. We thank J. Shine (SCGC, Belle Glade, FL, U.S.A.) and J. Comstock (United States Department of Agriculture, Canal Point, FL, U.S.A.) for supplying healthy sugarcane planting material and sugarcane infected by *X. albilineans* XaFL07-1; Y.-Y. Chen of the Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University (Taiwan, ROC) for sending plasmid pRK-mopB; P. Rayside for technical assistance; and M. Royer (Cirad, Montpellier, France) for identification of methyltransferase XALc_2634 and fruitful discussions and suggestions.

LITERATURE CITED

- Achouak, W., Heulin, T., and Pagès, J.-M. 2001. Multiple facets of bacterial porins. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett. 199:1-7.
- Arora, A., Rinehart, D., Szabo, G., and Tamm, L. K. 2000. Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. J. Biol. Chem. 275:1594-1600.
- Balsanelli, E., Serrato, R. V., de Baura, V. A., Sasaki, G., Yates, M. G., Rigo, L. U., Pedrosa, F. O., de Souza, E. M., and Monteiro, R. 2010. *Herbaspirillum seropedicae rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. Environ. Microbiol. 12:2233-2244.
- Barrios, A. F. G., Zuo, R., Ren, D., and Wood, T. K. 2006. Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. Biotechnol. Bioeng. 93:188-200.
- Birch, R. G. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. Mol. Plant Pathol. 2:1-11.
- Birch, R. G., and Patil, S. S. 1985. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 131:1069-1075.
- Birch, R. G., and Patil, S. S. 1987a. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. Physiol. Mol. Plant Pathol. 30:199-206.
- Birch, R. G., and Patil, S. S. 1987b. Evidence that an albicidin-like phytoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. Physiol. Mol. Plant Pathol. 30:207-214.
- Bolstad, A. I., and Jensen, H. B. 1993. Complete sequence of *omp1*, the structural gene encoding the 40-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium nucleatum* strain Fev1. Gene 132:107-112.
- Bond, P. J., Faraldo-Gómez, J. D., and Sansom, M. S. P. 2002. OmpA: A pore or not a pore? Simulation and modelling studies. Biophys. J. 83:763-775.
- Bosshart, P. D., Iordanov, I., Garzon-Coral, C., Demange, P., Engel, A., Milon, A., and Müller, D. J. 2012. The transmembrane protein KpOmpA anchoring the outer membrane of *Klebsiella pneumoniae* unfolds and refolds in response to tensile load. Structure 20:121-127.
- Braun, G., and Cole, S. T. 1982. The nucleotide sequence coding for major outer membrane protein OmpA of *Shigella dysenteriae*. Nucleic Acids Res. 10:2367-2378.
- Bremer, E., Beck, E., Hindennach, I., Sonntag, I., and Henning, U. 1980.

- Cloned structural gene (*ompA*) for an integral outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12: Localization on hybrid plasmid pTU100 and expression of a fragment of the gene. *Mol. Gen. Genet.* 179:13-20.
- Bruening, G., Civerolo, E., Kirkpatrick, B., and Gilchrist, D. 2002. Virulence analysis of the Pierce's disease agent *Xylella fastidiosa*. Pages 286-289 in: Proceedings of the 2002 Pierce's Disease Research Symposium. California Department of Food and Agriculture, San Diego, CA. U.S.A.
- Bruening, G., Civerolo, E., Dandekar, A. M., and Gupta, G. 2003. Roles of *Xylella fastidiosa* proteins in virulence. Pages 135-137 in: Proceedings 2003 Pierce's Disease Research Symposium. California Department of Food and Agriculture, San Diego, CA. U.S.A.
- Bruening, G., Civerolo, E., Feldstein, P., Francis, M., Dandekar, A. M., and Gupta, G. 2005. Exploiting *Xylella fastidiosa* proteins for Pierce's disease control. Pages 221-224 in: Proceedings 2005 Pierce's Disease Research Symposium. California Department of Food and Agriculture, San Diego, CA. U.S.A.
- Bruening, G., Civerolo, E., Feldstein, P., Dandekar, A. M., and Gupta, G. 2007. Exploiting *Xylella fastidiosa* proteins for Pierce's disease control. Pages 173-176 in: Proceedings 2007 Pierce's Disease Research Symposium. California Department of Food and Agriculture, San Diego, CA. U.S.A.
- Champoiseau, P., Daugrois, J.-H., Girard, J.-C., Royer, M., and Rott, P. 2006a. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 96:33-45.
- Champoiseau, P., Daugrois, J.-H., Pieretti, I., Cociancich, S., Royer, M., and Rott, P. 2006b. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. *Phytopathology* 96:1081-1091.
- Chen, Y.-Y., Wu, C.-H., Lin, J.-W., Weng, S.-F., and Tseng, Y.-H. 2010. Mutation of the gene encoding a major outer-membrane protein in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causes pleiotropic effects, including loss of pathogenicity. *Microbiology* 156:2842-2854.
- Cornelis, G. R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:811-825.
- Dale, C., Young, S. A., Haydon, D. T., and Welburn, S. C. 2001. The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:1883-1888.
- Dale, C., Jones, T., and Pontes, M. 2004. Degenerative evolution and functional diversification of type-III secretion systems in the insect endosymbiont *Sodalis glossinidius*. *Mol. Biol. Evol.* 22:758-766.
- Daugrois, J.H., Dumont, V., Champoiseau, P., Costet, L., Boisne-Noc, R., and Rott, P. 2003. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:445-458.
- Davis, M. J., Rott, P., Baudin, P., and Dean, J. L. 1994. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 78:78-82.
- De Bruijn, F. J., and Lupski, J. R. 1984. The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids—A review. *Gene* 27:131-149.
- DeFeyer, R., Kado, C. I., and Gabriel, D. W. 1990. Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. *Gene* 88:65-72.
- DeFeyer, R., Yang, Y., and Gabriel, D. W. 1993. Gene-for-genes interactions between cotton *R* genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* *avr* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:225-237.
- Hashimi, S. M., Wall, M. K., Smith, A. B., Maxwell, A., and Birch, R. G. 2007. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:181-187.
- Kingsley, M. T., Gabriel, D. W., Marlow, G. C., and Roberts, P. D. 1993. The *opsX* locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide. *J. Bacteriol.* 175:5839-5850.
- Koebnik, R., Locher, K. P., and Van Gelder, P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: Barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* 37:239-253.
- Laage, R., and Langosch, D. 2001. Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins. *Traffic* 2:99-104.
- Lee, J., Kang, S., Park, S. I., Woo, H.-J., and Kwon, W. 2004. Molecular cloning and characterization of the gene for outer membrane protein H in a *Pasteurella multocida* (D:4) isolate from pigs with atrophic rhinitis symptoms in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:1343-1349.
- Ma, Q., and Wood, T. K. 2009. OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environ. Microbiol.* 11:2735-2746.
- Marguerettaz, M., Pieretti, I., Gayral, P., Puig, J., Brin, C., Cociancich, S., Poussier, S., Rott, P., and Royer, M. 2010. Genomic and evolutionary features of the SPI-1 type III secretion system that is present in *Xanthomonas albilineans* but is not essential for xylem colonization and symptom development of sugarcane leaf scald. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:246-259.
- McBroom, A. J., and Kuehn, M. J. 2007. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* 63:545-558.
- Mohan Nair, M. K., and Venkitanarayanan, K. 2007. Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. *Pediatr. Res.* 62:664-669.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:593-656.
- Pautsch, A., and Schulz, G. E. 1998. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol.* 5:1013-1017.
- Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrière, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.-A., Lauber, E., Manceau, C., Mangenot, S., Poussier, S., Segurens, B., Szurek, B., Verdier, V., Arlat, M., and Rott, P. 2009. The complete genome of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics* 10:616.
- Rott, P., and Chagvardieff, P. 1984. Inoculation de la canne à sucre (*Saccharum sp.*) cultivée in vitro avec *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. *Agron. Trop.* 39:89-92.
- Rott, P., and Davis, M. J. 2000. Leaf scald. Pages 38-44 in: A Guide to Sugarcane Diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft, and A. S. Saumtally, eds. La Librairie du Cirad, Montpellier, France.
- Rott, P. C., Mohamed, I. S., Klett, P., Soupa, D., de Saint-Albin, A., Feldmann, P., and Letourmy, P. 1997. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. *Phytopathology* 87:1202-1213.
- Rott, P., Fleites, L., Marlow, G., Royer, M., and Gabriel, D. W. 2011. Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:594-605.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
- Sidhu, V. K., Vorholter, F. J., Niehaus, K., and Watt, S. A. 2008. Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiology* 8:87-102.
- Singamsetty, V.K., Wang, Y., Shimada, H., and Prasadara, N.V. 2008. Outer membrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion. *Microb. Pathogen.* 45:181-191.
- Singh, S. P., Williams, Y. U., Miller, S., and Nikaido, H. 2003. The C-terminal domain of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium OmpA is an immunodominant antigen in mice but appears to be only partially exposed on the bacterial cell surface. *Infect. Immun.* 71:3937-3946.
- Smith, S. G. J., Mahon, V., Lambert, M. A., and Fagan, R. P. 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* 273:1-11.
- Sperandio, V., Bailey, C., Giron, J. A., DiRita, V. J., Silveira, W. D., Vettore, A. L., and Kaper, J. B. 1996. Cloning and characterization of the gene encoding the OmpU outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 64:5406-5409.
- Sugawara, E., and Nikaido, H. 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267:2507-2511.
- Schwechheimer, C., Sullivan, C. J., and Kuehn, M. J. 2013. Envelope control of outer membrane vesicle production in gram-negative bacteria. *Biochemistry* 52:3031-3040.
- Von Gabain, A., Belasco, J. G., Schottel, J. L., Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N. 1983. Decay of mRNA in *Escherichia coli*: Investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Biochemistry* 80:653-657.
- Wang, Y., and Kim, K. S. 2002. Role of OmpA and IbeB in *Escherichia coli* K1 invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Pediatr. Res.* 51:559-563.
- Wu, H.-H., Yang, Y.-Y., Hsieh, W.-S., Lee, C.-H., Leu, S.-J., and Chen, M.-R. 2009. OmpA is the critical component for *Escherichia coli* invasion-induced astrocyte activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68:677-690.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

pDRAW32 DNA analysis software: www.acaclone.com
 National Center for Biotechnology Information BLAST database: blast.ncbi.nlm.nih.gov
 Institut de Génétique et Microbiologie ARNold database: rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold
 Softberry database: linux1.softberry.com

Annexe 2 : Mensi I, Girard J-C, Pieretti I, Larbre F, Roumagnac P, Royer M, Rott P, 2013. First Report of Sugarcane Leaf Scald in Gabon Caused by a Highly Virulent and Aggressive Strain of *Xanthomonas albilineans*. *Plant Disease*, 97(7):988.

First Report of Sugarcane Leaf Scald in Gabon Caused by a Highly Virulent and Aggressive Strain of *Xanthomonas albilineans*

I. Mensi, J.-C. Girard, and I. Pieretti, CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France; F. Larbre, SUCAF GABON, BP610, Franceville, Gabon; and P. Roumagnac, M. Royer, and P. Rott, CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France

During a disease inspection at the sugarcane estate SUCAF near Franceville, Gabon, in March 2011, 0.5 to 1 cm wide chlorotic stripes covered with many small red streaks were observed on sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves of a single plant of cultivar R581. After removal of the leaves covering the base of the stalks, abnormal development of basal side shoots was also observed. Transversal sections of a diseased stalk showed reddening of the vessels near the nodes. Circular, convex, smooth, shiny, translucent, non-mucoid, honey-yellow pigmented bacterial colonies were isolated from stalk pieces and side shoots on XAS selective agar medium (1). The nucleotide sequence of the 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) of a representative colony was shown to be 100% identical to the 16S-23S ITS sequence from the genome of *Xanthomonas albilineans* strain GPE PC73 (GenBank: FP565176.1). This strain from Gabon was named GAB266. Sugarcane stalks of greenhouse grown cultivar CP68-1026 were inoculated with *X. albilineans* strains XaFL07-1 from Florida, GPE PC73 from Guadeloupe, and GAB266. Five stalks were inoculated by the modified decapitation method (3) with each strain or with a water control. One month post-inoculation (MPI), white pencil lines and severe necrosis were observed on leaves inoculated with strains XaFL07-1 and GPE PC73, and no disease symptoms appeared on non-inoculated leaves that developed 2 to 3 MPI. These results are in agreement with those generally obtained after inoculation of susceptible sugarcane cultivars with *X. albilineans* strains from various geographical locations under greenhouse conditions (Rott, unpublished results). In contrast, 1 MPI, only discrete white to red pencil lines were observed along with necrosis on leaves inoculated with strain GAB266, and by 2 to 3 MPI, all five inoculated plants were wilted. The pathogen was successfully reisolated by the stalk blot inoculation technique (3) with XAS medium, from all five inoculated stalks and from 98 of 114 internodes. In a second greenhouse experiment, the

same three strains of *X. albilineans* were inoculated as described above into five sugarcane cultivars differing in resistance to leaf scald in Guadeloupe (2) (CP68-1026, highly susceptible; B69566, susceptible; R570, tolerant; B8008, resistant; Co6415, highly resistant). The same symptoms as those described above were again observed on inoculated leaves of the five sugarcane cultivars 1 MPI. Strains XaFL07-1 and GPE PC73 produced occasionally a single pencil line on non-inoculated leaves 2 to 3 MPI, but only strain GAB266 caused leaf scalding and/or plant death 2 to 3 MPI: cultivar CP68-1026 (5 of 5 plants), B69566 (5 of 5 plants), R570 (4 of 5 plants), B8008 (5 of 5 plants), and only non-inoculated leaves of cultivar Co6415 remained symptomless (5 plants). Strain GAB266 from Gabon appeared, therefore, more virulent and aggressive than the two strains of *X. albilineans* from Florida and Guadeloupe. To our knowledge, this is the first report of leaf scald of sugarcane in Gabon and the first description of an unusual highly virulent and aggressive strain of *X. albilineans*. A large-scale survey needs to be undertaken to determine the distribution of leaf scald disease and this new pathotype/race of *X. albilineans* in Gabon and other geographical locations.

References: (1) M. J. Davis et al. Plant Dis. 78:78, 1994. (2) P. Rott et al. Phytopathology 87:1202, 1997 (3) P. Rott et al. Mol. Plant-Microbe Interact. 24:594, 2011.

Annexe 3 : Rott P, Fleites LA, **Mensi I**, Sheppard L, Daugrois JH, Dow M, Gabriel DW, 2013. The RpfCG two-component system negatively regulates the colonization of sugarcane stalks by *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology*, 159:1149-1159.

Abstract

The genome of *X. albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald, carries a gene cluster encoding a predicted quorum sensing system that is highly related to the diffusible signaling factor (DSF)-systems of the plant pathogens *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas campestris*. In these latter pathogens, a cluster of regulation of pathogenicity factors (*rpf*) genes encodes the DSF system and is involved in control of various cellular processes. Mutation of *X. albilineans rpfF*, encoding a predicted DSF synthase, in Florida strain XaFL07-1 resulted in a small reduction of disease severity (DS). Single knockout mutations of *rpfC* and *rpfG* (encoding a predicted DSF sensor and regulator, respectively) had no effect on disease severity or swimming motility of the pathogen. However, capacity of the pathogen to cause disease was slightly reduced and swimming motility was severely affected when *rpfG* and *rpfC* were both deleted. Similar results were obtained when the entire *rpfGCF* region was deleted. Surprisingly, when the pathogen was mutated in *rpfG* or *rpfC* (single or double mutations) it was able to colonize sugarcane spatially more efficiently than the wild type. Mutation in *rpfF* alone did not affect the degree of spatial invasion. We conclude that the DSF signal contributes to symptom expression but not to invasion of sugarcane stalks by *X. albilineans* strain XaFL07-1, which is mainly controlled by the RpfCG two-component system.

The RpfCG two-component system negatively regulates the colonization of sugar cane stalks by *Xanthomonas albilineans*

Philippe Rott,^{1,2} Laura A. Fleites,² Imène Mensi,¹ Lauren Sheppard,¹ Jean-Heinrich Daugrois,¹ J. Maxwell Dow³ and Dean W. Gabriel²

Correspondence

Philippe Rott

philippe.rott@cirad.fr

¹CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France

²University of Florida, Department of Plant Pathology, Gainesville 32611, Florida, USA

³Department of Microbiology, Biosciences Institute, University College Cork, Cork, Ireland

The genome of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugar cane leaf scald, carries a gene cluster encoding a predicted quorum sensing system that is highly related to the diffusible signalling factor (DSF) systems of the plant pathogens *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas campestris*. In these latter pathogens, a cluster of regulation of pathogenicity factors (*rpf*) genes encodes the DSF system and is involved in control of various cellular processes. Mutation of *Xanthomonas albilineans* *rpfF*, encoding a predicted DSF synthase, in Florida strain XaFL07-1 resulted in a small reduction of disease severity (DS). Single-knockout mutations of *rpfC* and *rpfG* (encoding a predicted DSF sensor and regulator, respectively) had no effect on DS or swimming motility of the pathogen. However, capacity of the pathogen to cause disease was slightly reduced and swimming motility was severely affected when *rpfG* and *rpfC* were both deleted. Similar results were obtained when the entire *rpfGCF* region was deleted. Surprisingly, when the pathogen was mutated in *rpfG* or *rpfC* (single or double mutations) it was able to colonize sugar cane spatially more efficiently than the wild-type. Mutation in *rpfF* alone did not affect the degree of spatial invasion. We conclude that the DSF signal contributes to symptom expression but not to invasion of sugar cane stalks by *Xanthomonas albilineans* strain XaFL07-1, which is mainly controlled by the RpfCG two-component system.

Received 18 December 2012

Accepted 25 March 2013

INTRODUCTION

Xanthomonas albilineans is a Gram-negative bacterium that causes leaf scald, a lethal disease of sugar cane (Ricaud & Ryan, 1989; Rott & Davis, 2000). This pathogen multiplies in the xylem and systemically colonizes the entire host plant, including the leaves, the stalk and the roots (Champoiseau *et al.*, 2006; Klett & Rott, 1994). Transmission occurs via infected cuttings, contaminated harvesting tools and aerial means. Disease symptoms vary from a single, white, narrow, sharply defined leaf stripe to complete wilting and necrosis of infected leaves, leading to plant death. Sugar cane leaves may also emerge with extensive white chlorosis from which the pathogen is sometimes absent. However, even if leaf scald symptoms result from changes in the chlorenchyma cells, *Xanthomonas albilineans* is constrained within the xylem (Birch, 2001).

In contrast to other pathogenic xanthomonads, *Xanthomonas albilineans* lacks a hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) type III secretion system (T3SS) that delivers effector proteins or virulence factors from the bacterial cytoplasm into the plant host cell (Pieretti *et al.*, 2009). The causal agent of leaf scald is also missing the *gum* gene cluster that is involved in biosynthesis of xanthan gum, an essential pathogenicity factor of *Xanthomonas* species (Danhorn & Fuqua, 2007). *Xanthomonas albilineans* produces albicidin, a unique and specific toxin that causes foliar symptoms of sugar cane leaf scald (Birch, 2001). However, albicidin-deficient strains of the pathogen are still able to colonize the sugar cane stalk. Toxin-deficient mutant isolates of strain XaFL07-1 from Florida are even able to cause disease symptoms, showing that albicidin is not always necessary for expression of leaf scald symptoms (Rott *et al.*, 2011). Other putative pathogenicity factors of *Xanthomonas albilineans* include hypothetical proteins, cell surface polysaccharides, a membrane fusion protein conferring resistance to novobiocin, transport proteins, TonB-dependent outer-membrane transporters and an OmpA family outer-membrane protein (Pieretti *et al.*, 2012; Rott *et al.*, 2011).

Abbreviations: DS, disease severity; DSF, diffusible signalling factor; ESC, extent of stalk colonization; ESC-lo, extent of lower stalk colonization; ESC-up, extent of upper stalk colonization; I, internode; LB, Luria–Bertani; MW, modified Wilbrink; T3SS, type III secretion system; USDA, United States Department of Agriculture.

The genome of *Xanthomonas albilineans* also contains a cluster of genes called regulation of pathogenicity factors (*rpf*) (Pieretti *et al.*, 2009). This cluster of genes encodes a quorum sensing (also called cell–cell signalling) system that controls several cellular and biological processes in *Xylella fastidiosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and several species of *Xanthomonas* (Barber *et al.*, 1997; Chatterjee *et al.*, 2008b; Dow, 2008; Fouhy *et al.*, 2007; He & Zhang, 2008; Tang *et al.*, 1991). The *rpf* gene cluster is especially used by these pathogenic bacteria to regulate the expression of factors contributing to virulence, such as extracellular polysaccharides, extracellular enzymes and flagellum synthesis (Dow *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2012; He *et al.*, 2006; Ryan & Dow, 2011; Wang *et al.*, 2012). A signal molecule called diffusible signalling factor (DSF) mediates this cell–cell signalling. The *rpfF* gene has been shown to be required for production of DSF (Barber *et al.*, 1997; Newman *et al.*, 2004), which is a *cis*-unsaturated fatty acid (Wang *et al.*, 2004). Perception of DSF and signal transduction depends on a two-component signal transduction system that comprises the sensor kinase RpfC and the regulator RpfG (He & Zhang, 2008; Ryan & Dow, 2011; Ryan *et al.*, 2012). The sensor RpfC is known to negatively regulate the synthesis of DSF, and mutation of *rpfc* results in overproduction of DSF. In contrast, mutation of *rpfG* has a negative effect on DSF levels in *Xanthomonas* spp. (He *et al.*, 2010; Slater *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2010).

Phenotypes due to mutation in different *rpf* genes vary according to the bacterial pathogen, from deficiency in virulence to hypervirulence, thus suggesting that members of the *Xanthomonadaceae* family have adapted their signalling system to fit specific needs for colonization of different hosts (Dow, 2008). In *Xanthomonas* species, mutation of *rpff* or *rpfC* results in reduction of virulence (Dow *et al.*, 2003; He & Zhang, 2008; Siciliano *et al.*, 2006; Thowthampitak *et al.*, 2008). In contrast, in *Xylella fastidiosa*, *rpff* mutants are more virulent than the wild-type strain when mechanically inoculated into plants (Newman *et al.*, 2004). However, DSF-deficient mutants of this pathogen are affected in transmission by its insect vector (sharpshooter leafhopper), showing that cell–cell signalling controls the interactions of *Xylella fastidiosa* with both plants and insects (Newman *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2008a). Furthermore, mutations of *rpff* and *rpfC* have opposite effects in *Xylella fastidiosa*. Mutation of *rpff* in this pathogen results in a bacterium that is able to spread more extensively to xylem vessels and to reach higher populations in these vessels than the wild-type strain (Chatterjee *et al.*, 2008b), whereas loss by mutation of the sensor RpfC results in a bacterium deficient in movement and multiplication within grapevine (Chatterjee *et al.*, 2008c).

Although a DSF-like molecule has been detected in *Xanthomonas albilineans* by Wang *et al.* (2004), the importance and role of DSF and of the different Rpf proteins in this sugar cane pathogen have yet to be described. We report herein the characterization of *rpff*

mutants of *Xanthomonas albilineans*. Our findings indicate further diversification in the role of the different Rpf components from that previously described for other xanthomonads.

METHODS

Bacterial strains and culture conditions. Strain XaFL07-1 of *Xanthomonas albilineans* was isolated in 2007 from a diseased sugar cane leaf that was sampled at the United States Department of Agriculture (USDA) Sugar Cane Field Station at Canal Point, FL. It was cultured routinely at 28–30 °C on modified Wilbrink's (MW) agar medium containing sucrose (10 g), peptone (5 g), K₂HPO₄·3H₂O (0.50 g), MgSO₄·7H₂O (0.25 g), Na₂SO₃ (0.05 g), agar (15 g) and distilled water (1 l), pH 6.8–7.0 (Davis *et al.*, 1994). Mutants of XaFL07-1 were produced and cultured on the same medium supplemented with appropriate antibiotics as described below. All strains of *Xanthomonas albilineans* were stored at –80 °C as turbid water suspensions and retrieved before mutagenesis or plant inoculation by plating on MW agar medium supplemented with appropriate antibiotics (Table 1). *Escherichia coli* strains were grown on Luria–Bertani (LB) agar or in LB broth at 37 °C, and were used and stored according to standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989).

Production of *rpff* mutants by deletion mutagenesis. For splice-overlap PCR (marker deletion), two regions approximately 1 kb long, upstream and downstream of the target gene, were independently PCR-amplified with their respective primer sets and cloned into pUFR080, as described by Castañeda *et al.* (2005). Primer sequences and PCR conditions for each target gene (*rpff*, *rpfG*, *rpfC*) or gene region (*rpffG* + *rpfC*, *rpfG* + *rpfC* + *rpff*) are described in Table 2. Each plasmid containing a splice-overlap PCR product that carried both ends of the target ORF but not the target region was electroporated into electrocompetent cells of *Xanthomonas albilineans* as described by Rott *et al.* (2011). Following electroporation, 1 ml liquid GW medium (MW medium without sucrose but supplemented with 10 g glucose l^{–1}) was added to the mix and the culture was grown at 30 °C for 2.5–4 h with shaking at 120 r.p.m. Culture aliquots (50 µl) were then spread on GW agar plates containing 20 mg kanamycin l^{–1}. Six-day-old colonies were subcultured on kanamycin-supplemented GW medium, and the resulting culture was streaked on regular MW medium containing sucrose to select for double recombination and exchange of the target gene by the truncated target gene(s). Colonies that grew on sucrose were analysed by PCR to verify deletion of target gene(s) using various primer sets described in Table 2.

DSF production bioassays. To detect DSF production with reporter strain *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8523 pL6engGUS (Slater *et al.*, 2000), strains to be tested were replicated by stab inoculation into SPA [sucrose (20 g), peptone (5 g), agar (15 g), distilled water (1 l), pH 6.8–7.0] or MW medium containing 40 µg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-GlcA) overlaid with 4 ml of a mix containing 2 ml 1.5 % Noble agar (w/v), X-GlcA (40 µg ml^{–1}) and 2 ml of reporter strain suspension (10⁷ c.f.u. ml^{–1} sterile distilled water). The plates were then incubated at 28–30 °C and, after 24–48 h incubation, DSF-producing strains were identified by a blue halo around the test culture of *Xanthomonas albilineans*.

Pathogenicity assays. All pathogenicity experiments were conducted at University of Florida under greenhouse conditions using healthy plants of sugar cane cultivar CP80-1743, moderately susceptible to leaf scald. Inoculum of *Xanthomonas albilineans* was prepared from 2 day-old agar cultures. Sugar cane stalks with at least

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain	Relevant characteristics*	Reference or source
<i>E. coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44</i> κ - <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> Mach1-T1 ^R	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>hsdR</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) Δ <i>recA1398</i> <i>endA1</i> <i>tonA</i> (confers resistance to phage T1)	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP10F ⁺	F' [<i>lacI</i> ^R Tn10 (Tet ^R)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> Str ^r <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>Xanthomonas</i> spp.		
8523	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , DSF ⁻ , Rif ^r	Tang <i>et al.</i> (1991)
8523/pL6engGUS	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 8523 containing pL6engGUS (pLAFR6, <i>engXCA:gusA</i> fusion), DSF ⁻ , Tc ^r	Slater <i>et al.</i> (2000)
XaFL07-1	<i>Xanthomonas albilineans</i> , wild-type from Florida, DSF ⁺	Rott <i>et al.</i> (2011)
XaFL07-1 derivatives†		
Δ <i>rpfF</i> M15	Δ <i>rpfF</i> , DSF ⁻	This work
Δ <i>rpfG</i> M6	Δ <i>rpfG</i> , defective in DSF receptor protein RpfG, DSF ⁺	This work
Δ <i>rpfC</i> M29	Δ <i>rpfC</i> , defective in DSF receptor protein RpfC, DSF ⁺	This work
Δ <i>rpfGC</i> M9	Δ <i>rpfG</i> Δ <i>rpfC</i> , defective in DSF receptor proteins RpfG and RpfC, DSF ⁺	This work
Δ <i>rpfGCF</i> M15	Δ <i>rpfF</i> Δ <i>rpfG</i> Δ <i>rpfC</i> , DSF ⁻ and defective in DSF receptor proteins RpfG and RpfC	This work
Δ <i>rpfGCF</i> M17	Δ <i>rpfF</i> Δ <i>rpfG</i> Δ <i>rpfC</i> , DSF ⁻ and defective in DSF receptor proteins RpfG and RpfC	This work
Plasmids		
pCR2.1-TOPO	3.9 kb; PCR cloning vector, Amp ^r Kn ^r	Invitrogen
pCR8/GW/TOPO	2.8 kb; PCR cloning vector, Sp ^r	Invitrogen
pUFR047	8.6 kb; IncW, Mob ⁺ , <i>lacZx</i> ⁺ , Par ⁺ , Gm ^r Amp ^r	De Feyter <i>et al.</i> (1993)
pUFR080	7.8 kb; <i>sacB</i> gene cloned into <i>Dra</i> III site of pAC3.1, Cole1, Mob ⁺ , <i>lacZx</i> ⁺ <i>sacB</i> , Cm ^r Kn ^r	Castañeda <i>et al.</i> (2005)
pPR010	5.0 kb; 2.2 kb <i>rpfC</i> -AD splice-overlap fragment cloned into pCR8/GW/TOPO, Sp ^r	This work
pPR011	5.0 kb; 2.2 kb <i>rpfG</i> + <i>rpfC</i> -AD splice-overlap fragment cloned into pCR8/GW/TOPO, Sp ^r	This work
pPR013	6.1 kb; 2.2 kb <i>rpfG</i> -AD splice-overlap fragment cloned into pCR2.1-TOPO, Amp ^r Kn ^r	This work
pPR016	6.1 kb; 2.1 kb <i>rpfG</i> + <i>rpfC</i> + <i>rpfF</i> -AD splice-overlap fragment cloned into pCR2.1-TOPO, Amp ^r Kn ^r	This work
pPR017	18.3 kb; 9.7 kb <i>Bam</i> HI digested <i>rpfB</i> - <i>prfB</i> fragment from pPYOAAB9CC10 cloned into pUFR047, Gm ^r Amp ^r	This work
pPR017Met	pPR017 transformed into chemically competent cells of <i>E. coli</i> containing pPYOAAB27CH12, Gm ^r Amp ^r	This work
pPR021	10.1 kb; 2.3 kb <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I <i>rpfG</i> -AD fragment from pPR013 cloned into pUFR080, Cm ^r Kn ^r	This work
pPR022	10.0 kb; 2.1 kb <i>Eco</i> RI <i>rpfC</i> -AD fragment from pPR010 cloned into pUFR080, Cm ^r Kn ^r	This work
pPR023	9.7 kb; 2.0 kb <i>Eco</i> RI <i>rpfG</i> + <i>rpfC</i> -AD fragment from pPR011 cloned into pUFR080, Cm ^r Kn ^r	This work
pPR024	10 kb; 2.2 kb <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I <i>rpfG</i> + <i>rpfC</i> + <i>rpfF</i> -AD fragment from pPR016 cloned into pUFR080, Cm ^r Kn ^r	This work
pPR026	6.1 kb; 2.2 kb <i>rpfF</i> -AD splice-overlap fragment cloned into pCR2.1-TOPO, Amp ^r Kn ^r	This work
pPR027	10.0 kb; 2.3 kb <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I <i>rpfF</i> -AD fragment from pPR026 cloned into pUFR080, Cm ^r Kn ^r	This work
pPYOAAB9CC10	15.3 kb genomic fragment from <i>Xanthomonas albilineans</i> GPE PC73 containing the <i>rpf</i> gene cluster and cloned into pCNS, Cm ^r	Pieretti <i>et al.</i> (2009)
pPYOAAB27CH12	10.6 kb genomic fragment from <i>Xanthomonas albilineans</i> GPE PC73 containing ORF XALc_2634 (methyltransferase) and cloned into pCNS, Cm ^r	Pieretti <i>et al.</i> (2009)

*Amp, ampicillin; Gm, gentamicin; Cm, chloramphenicol; Kn, kanamycin; Rif, rifampicin; Sp, spectinomycin; Str, streptomycin; Tet, tetracycline; DSF, diffusible signal factor.

†All deletion derivatives were made by splice-overlap PCR at the indicated XaFL07-1 locus.

four internodes were inoculated with 10⁸ c.f.u. ml⁻¹ bacterial suspensions in sterile distilled water by a decapitation method, as described by Rott *et al.* (2011). In this method, the spindle leaves on a stalk were cut off just below the third visible dewlap with pruning

shears and 0.2–0.5 ml inoculum was then deposited onto the cut surface. In each pathogenicity assay, sugar cane stalks were distributed in the greenhouse using a randomized complete block design with three to eight replications of one plant each.

Table 2. Primers and conditions used in this study

Primer name	Sequence*	T _m (°C)†	Gene/region amplified
For splice-overlap PCR			
rpff-A1	CCTCGGCACCACCATCGCCAA	66	rpff upstream DNA
rpff-B1	TCATACGCGTTCAGATCTTATCAATGACGCCACGGTCCGCGA	66	rpff upstream DNA
rpff-C1	TAAGATCTGAACGCGTATGAGTGGATGCTACACCTTGGTACAC	66	rpff downstream DNA
rpff-D1	ATGCTGACCCATCGCAACCTGG	66	rpff downstream DNA
rpfg-A1	GAAGTGGAAACGCCAATGATGCA	65	rpfg upstream DNA
rpfg-B3	TCATACGCGTTCAGATCTTATCAGGCACAGCGCGGGCTACTG	65	rpfg upstream DNA
rpfg-C4	TAAGATCTGAACGCGTATGACTGGACCATGGATGCGACACTC	64	rpfg downstream DNA
rpfg-D1	CGCACACGGATGTCGACCTTAC	64	rpfg downstream DNA
rpfc-A1	GATCAAAACATCCGCCCGCACGA	65	rpfc upstream DNA
rpfc-B5	TCATACGCGTTCAGATCTTATCACACGTACACCCCCGGTCCG	65	rpfc upstream DNA
rpfc-C5	TAAGATCTGAACGCGTATGAGGGGTGCTAAACCGGGCTATTC	65	rpfc downstream DNA
rpfc-D1	TACAAGCAGCCGCGCATCGTC	65	rpfc downstream DNA
For deletion confirmation			
rpffXaF5	GCGCACGGCTTCTCAGTTA	57	rpff internal fragment
rpffXaR5	TTCTGTGCGTCGGGTCTGC	57	rpff internal fragment
rpfgXaF1	CGATCTGTTGCTGCTCGACT	57	rpfg internal fragment
rpfgXaR1	GAATCGCTTCGCCGACCAA	57	rpfg internal fragment
rpfcXaF1	GTCCCCGTTCTCCTTGTC	61	rpfc internal fragment
rpfcXaR1	ATCCAGCACCTCCTCGACCA	61	rpfc internal fragment
Splice-overlap PCR primers	See above		

*Underlined sequences indicate homology regions added for splice-overlap PCR. All primer sequences are from 5' to 3'.

†Melting temperature used.

Scoring of symptoms caused by *Xanthomonas albilineans*.

Leaf scald symptoms were recorded on emerging leaves one month after inoculation using a symptom severity scale ranging from 0 to 6, where 0=no symptoms, 1=one to five pencil-line stripes, 2=six to ten pencil-line stripes, 3=more than ten pencil-line stripes, 4=leaf chlorosis or less than 10% leaf necrosis, 5=10–50% leaf necrosis and 6=51–100% leaf necrosis (Rott *et al.*, 2011). Inoculated stalks were rated individually and disease severity (DS) for each stalk was based on the average score of the three inoculated leaves showing the most severe symptoms.

Determination of sugar cane stalk colonization by *Xanthomonas albilineans*.

Populations of *Xanthomonas albilineans* were determined in 12 (internodes I₋₅ to I₊₆) to 15 (I₋₅ to I₊₉) stalk locations by the stalk blot inoculation technique two months after inoculation. Internodes I₀ to I₊₄ corresponded to the location of the five stalk internodes that showed reduced growth after mechanical plant inoculation using the decapitation method, which cuts leaves still attached to their internodes (the decapitation site is above the growing point). These reduced-growth internodes were attached to the inoculated leaves and were therefore considered to be entry points of the pathogen into the sugar cane stalk. Stalks were destructively sampled individually by cutting at the soil level with pruning shears. The rind of the stalk was cleaned with absorbent paper and flamed with alcohol to ensure external sterilization. Each stalk location was then aseptically cut transversally, in the middle, with sterile pruning shears. Pruning shears were systematically flamed with alcohol between each stalk location and each stalk. Cut sections of stalk internodes were all pressed onto two plates each of WCNCB medium (MW agar medium supplemented with 25 mg cephalixin l⁻¹, 30 mg novobiocin l⁻¹, 50 mg cycloheximide l⁻¹ and 12.5 mg benomyl l⁻¹) (Rott *et al.*, 2011).

Growth of *Xanthomonas albilineans* was recorded after 5–6 days of incubation of agar plates at 30 °C. Pathogen population densities were

assessed in each internode using a 0–4 scale, where 0=no bacterial colony in the stalk imprint, 1=one to ten colonies in the stalk imprint, 2=more than ten colonies or confluent growth of bacteria in less than 25% of the stalk imprint, 3=confluent growth of bacteria in 25–75% of the stalk imprint, 4=confluent growth of bacteria in more than 75% of the stalk imprint. Extent of stalk colonization (ESC) was expressed as ESC=100 [(1 × N₁ + 2 × N₂ + 3 × N₃ + 4 × N₄)/4 × N_T], where N_i=number of internodes with score *i* and N_T=total number of internodes.

Swimming motility of *Xanthomonas albilineans*. Swimming motility was assayed with MW medium and SPA medium, both containing only 0.25% (w/v) agar. Strains were stab inoculated with a sterile loop to the bottom of the Petri dish, and all plates were inoculated at least in triplicate (Rott *et al.*, 2011). Swim plates were incubated at 30 °C, and the diameter of haloes due to bacterial migration was measured 6–11 days post-inoculation.

Cloning of *rpf* genes and complementation. A gene cluster from *rpfB* to *rpfF* comprising *rpfF*, *rpfC* and *rpfG* of *Xanthomonas albilineans* GPE PC73 was cut from pPYOAB9CC10 with *Bam*HI and ligated into the same sites of pUFR047 to make pPR017 (Table 1). Plasmid pPR017 were electroporated into electrocompetent cells of *Xanthomonas albilineans* as described by Rott *et al.* (2011). Following electroporation, 1 ml liquid MW medium was added to the mix and the culture was grown at 30 °C for 2.5 h with shaking at 120 r.p.m. Culture aliquots (50 µl) were then spread on MW agar plates containing 3 mg gentamicin l⁻¹. Six-day-old colonies were subcultured on gentamicin-supplemented MW medium and stored at –80 °C upon further testing.

The genome of sequenced *Xanthomonas albilineans* strain GPE PC73 contains a restriction enzyme gene (XALc_2635) that is associated with a methyltransferase gene (XALc_2634), and methyltransferases are known to protect host DNA from cleavage by its own restriction

enzymes and have been used experimentally for this purpose (Geier & Modrich 1979; DeFeyter & Gabriel, 1991). Plasmid pPR017 was therefore transferred from *E. coli* DH5 α into *E. coli* DH5 α containing plasmid pPY0AAB27CH12 (including methyltransferase XALc_2634) to make pPR017Met (Table 1), which was then used for complementation experiments.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed with SAS version 9.2 (SAS Institute). To perform variance analysis with independent samples, DS and stalk colonization data were arcsin transformed to stabilize variance with the function $y = \arcsin(\sqrt{sm^{-1}})$ for each replication, with s being the read score and m being the upper limit of the score. For DS, $y = \arcsin[\sqrt{(DS/6)}]$ and for stalk colonization, $y = \arcsin[\sqrt{(ESC/100)}]$. Data for stalk size (y =stalk size in cm) were not transformed. Variance analyses were performed under GLM procedure with model y =strain for DS, ESC and stalk size, and strains were compared using the test of Student–Newman–Keuls (SNK option under means statement in GLM procedure).

RESULTS AND DISCUSSION

Organization of the *rpf* gene cluster in *Xanthomonas albilineans*

In *Xanthomonas albilineans* strain GPE PC73, which is completely sequenced (Pieretti *et al.*, 2009), the *rpf* cluster comprises six genes (*rpfA*, *rpfB*, *rpfF*, *rpfC*, *rpfG* and *rpfE*) with similar organization to that in other *Xanthomonas* species, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Xylella fastidiosa*. Importantly, the *Xanthomonas albilineans* genome carries *rpfF*, which is predicted to encode the DSF synthase and is convergently transcribed to *rpfC* and *rpfG* which encode a complex two-component system implicated in DSF signal transduction in other bacteria. The amino-acid sequences of RpfF, RpfC and RpfG of *Xanthomonas albilineans* strain GPE PC73 show high similarity to those in other xanthomonads (62–97 %); in BLASTP comparisons (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* for example, *E* values were all less than 10^{-100} and homologies exist throughout the length of the proteins.

Effects of mutation of *rpf* genes on DSF production by *Xanthomonas albilineans* strain XaFL07-1

Deletion mutagenesis was performed to generate mutants of *rpfF* ($\Delta rpfF$ M15), *rpfG* ($\Delta rpfG$ M6), *rpfC* ($\Delta rpfC$ M29), *rpfGC* ($\Delta rpfGC$ M9) and *rpfGCF* (isolates $\Delta rpfGCF$ M15 and $\Delta rpfGCF$ M17). All mutants were verified by PCR analysis using primers flanking the deleted gene location (Table 2). As expected, the *rpfF* and *rpfGCF* mutants did not produce any detectable DSF, as shown by a clear zone around the bacterial cultures, in contrast to XaFL07-1, which showed a blue halo within 48 h of growth (Table 3). The *rpfG*, *rpfC* and *rpfGC* mutants exhibited a blue halo that was larger than the one shown by the wild-type strain, indicating overproduction of DSF by these mutant strains. The finding of DSF overproduction by the *rpfC* mutant is consistent with the effects of mutation of this gene in other *Xanthomonas* species and *Xylella* (Chatterjee *et al.*, 2008c;

Slater *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). However, mutation of *rpfG* in other *Xanthomonas* species gives rise to a reduction in DSF synthesis (He *et al.*, 2010; Slater *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2010), indicating a diversification of Rpf function.

DS and sugar cane stalk colonization by *rpf* mutants of *Xanthomonas albilineans*

All *rpf* single, double and triple mutants and the wild-type strain XaFL07-1 were inoculated into sugar cane in a greenhouse experiment. All strains of the pathogen produced disease symptoms in the leaves, which included pencil lines, chlorosis and leaf necrosis (Fig. 1) and reduced the growth of sugar cane (Fig. 2), so that the size of stalk internodes 0–7 was more reduced than those of the control plants inoculated with water. Two months after inoculation, all mutants were also successfully reisolated from the inoculated sugar cane plants by the stalk blot inoculation technique.

DS of the *rpfF* mutant ($\Delta rpfF$ M15) was slightly reduced when compared with the two wild-type isolates of *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1, whereas DS of the mutant strains $\Delta rpfC$ M29 and $\Delta rpfG$ M6 was similar to DS caused by the wild-type isolates (Table 4). However, DS of the double mutant $\Delta rpfGC$ M9 and triple mutant isolates

Table 3. Characteristics of *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 and *rpf* mutants

Strain	DSF production*	Swimming motility†
XaFL07-1 A	+	+++
XaFL07-1 B‡	+	+++
$\Delta rpfF$ M15	–	++ to +++
$\Delta rpfG$ M6	++	+++
$\Delta rpfC$ M29	++	+++
$\Delta rpfGC$ M9	++	+
$\Delta rpfGCF$ M15	–	+
$\Delta rpfGCF$ M17	–	+

*Determined using *Xanthomonas campestris* 8523/pL6engGUS (Table 1). DSF production identified by a blue halo around the test culture of *Xanthomonas albilineans* is assessed as diameter of the blue halo compared with wild-type XaFL07-1. –, No DSF production (no blue halo); +, DSF production level of wild-type (diameter of blue halo 12–14 mm); ++, production of more DSF than wild-type (overproduction of DSF: diameter of blue halo 17–29 mm). Data are from at least two independent assays with four to six replications per assay. †Determined in 0.25 % MW or SPA agar medium. Swimming motility of *Xanthomonas albilineans* is rated as size of growth halo in agar medium compared with wild-type XaFL07-1. +, Severely reduced motility (Fig. 3; growth halo 13–15 mm); ++, reduced motility (growth halo 21–23 mm); +++, motility equal or similar to wild-type (growth halo 25–30 mm). Data are from at least three independent assays with three replications per assay. In each assay, differences in halo diameters between strains of the different motility groups were statistically significant (data not shown).

‡Freshly isolated from a symptomatic inoculated sugar cane plant.



Fig. 1. Leaf scald symptoms caused by *Xanthomonas albilineans* after inoculation of sugar cane cultivar CP80-1743. (a) Symptomless leaf inoculated with water (control). Pencil-line stripes (PL) and necrosis (N) on leaves produced by (b) wild-type XaFL07-1 (WT), (c) mutant $\Delta rpfC$ M29 (DSF sensor deficient) and (d) mutant $\Delta rpfGCF$ M17 (deficient in DSF synthase and RpfGC DSF transduction system). All leaves were photographed 1 month after plant inoculation.

$\Delta rpfGCF$ M15 and $\Delta rpfGCF$ M17 was slightly reduced when compared with the two isolates of *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 (Table 4).

In addition to assessing disease symptoms, the ability of the different bacterial strains to move in the sugar cane stalk was examined. In two initial experiments, where only two to three stalks were analysed per mutant, the *rpfG* M6 and *rpfC* M29 mutants appeared to be able to move in the stalk more effectively than the wild-type. In the first of these inoculation trials, mutant $\Delta rpfC$ M29 was found in 33 of 33 (100 %) internodes, whereas *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 was found in 24 of 36 (67 %) internodes. In the second trial, $\Delta rpfG$ M6, $\Delta rpfGC$ M9 and $\Delta rpfGCF$ M17 were found in 24 of 25 (96 %), 20 of 26 (77 %) and 23 of 26 (88 %) internodes, respectively, whereas *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 was found in 29 of 38 (76 %) internodes.

These observations prompted us to investigate more closely the capacity of the *rpf* mutants to move spatially in sugar cane stalks. The two wild-type isolates and six *rpf* mutant strains were successfully reisolated from internodes of inoculated stalks and the number of infected internodes and efficacy of internode colonization was expressed as extent of entire stalk colonization (ESC), extent of lower stalk colonization (ESC-lo) and extent of upper stalk colonization (ESC-up). ESC and ESC-lo of the DSF-deficient mutant ($\Delta rpfF$ M15) were not different from those of the two isolates of *Xanthomonas albilineans*

XaFL07-1 (Table 4), although ESC-up of $\Delta rpfF$ M15 (85) was slightly lower than ESC-up of the two wild-type isolates (93–97). In contrast, ESC of all mutants affecting the RpfCG two-component system ($\Delta rpfG$ M6, $\Delta rpfC$ M29, $\Delta rpfGC$ M9, $\Delta rpfGCF$ M15 and $\Delta rpfGCF$ M17) showed higher ESC than the two wild-type isolates of *Xanthomonas albilineans* (Table 4 and Fig. 2). The difference in stalk colonization between these mutants and the wild-type isolates was restricted to the lower part of the stalk (ESC-lo) and was not found in the upper part (Table 4).

Swimming motility of *rpf* mutants of *Xanthomonas albilineans*

The effects of mutation of *rpfG* and *rpfC* on colonization of stalks by *Xanthomonas albilineans* prompted us to examine the influence of these genes on expression of swimming motility, a factor that might influence colonization and virulence, as has been shown in other models (Ryan & Dow, 2011). Swimming motility of the mutant strains $\Delta rpfF$ M15, $\Delta rpfG$ M6 and $\Delta rpfC$ M29 was similar to swimming motility of wild-type strain *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 (Table 3 and Fig. 3). In contrast, mutant $\Delta rpfGC$ M9 and mutant isolates $\Delta rpfGCF$ M15 and $\Delta rpfGCF$ M17 were severely affected in motility when compared with the wild-type (motility assessed independently three times) (Table 3 and Fig. 3). Swimming motility does therefore not appear essential for



Fig. 2. Sugar cane stalks inoculated with *Xanthomonas albilineans*. (a) Effect of *Xanthomonas albilineans* on sugar cane growth: reduced internode size of stalks caused by wild-type XaFL07-1 (stalks labelled wt) and mutant $\Delta rpfF$ M15 (stalks labelled $\Delta rpfF$) compared with distilled water (stalk labelled C). White vertical bars represent growth size of seven internodes 2 months after inoculation and removal of leaves. (b) Extent of stalk colonization by *Xanthomonas albilineans*, 2 months after inoculation of sugar cane with wild-type XaFL07-1 (WT) and mutant $\Delta rpfC$ M29 ($\Delta rpfC$). The vertical lines indicate maximum distance reached by each strain within the sugar cane stalk.

Xanthomonas albilineans in planta because mutant $\Delta rpfGC$ M9 and mutant isolates $\Delta rpfGCF$ M15 and $\Delta rpfGCF$ M17 were able to colonize the sugar cane stalk more efficiently than the wild-type strain of the pathogen, as did mutants $\Delta rpfG$ M6 and $\Delta rpfC$ M29. Mutant $\Delta rpfGC$ M9 and mutant isolates $\Delta rpfGCF$ M15 and $\Delta rpfGCF$ M17 were, however, slightly affected in DS observed on leaves, suggesting the use by *Xanthomonas albilineans* of different colonization mechanisms in the leaf and in the stalk. Swimming motility may not be used by the pathogen to spread or move within the xylem, and the polar flagellum of *Xanthomonas albilineans* may even not be produced in planta. *Xylella fastidiosa* is a non-flagellated bacterium that colonizes the host xylem using type IV pili and twitching motility (Li *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2008a). *Xanthomonas albilineans* may similarly use type IV pili, which are found in the *Xanthomonas albilineans* genome, to spread in the sugar cane xylem.

In *Xanthomonas* species and *Xylella fastidiosa*, biofilm formation is essential for virulence and is controlled by DSF (Chatterjee *et al.*, 2010; Dow, 2008; Dow *et al.*, 2003; He & Zhang, 2008; Ryan & Dow, 2011; Torres *et al.*, 2007). However, microscopic observations of *rpf* mutants of *Xanthomonas albilineans* in inoculated plants showed that these mutants were still able to form bacterial aggregates in

xylem vessels (I. Mensi, unpublished data), suggesting that DSF does not control biofilm formation in this pathogen.

Complementation of *rpf* mutants of *Xanthomonas albilineans*

Initial attempts to complement *rpf* mutants of *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 with plasmid pPR017 (containing gene cluster *rpfB* to *rpfG*) failed. Only a few colonies grew on gentamicin-supplemented MW medium after transfer of pPR017 into *Xanthomonas albilineans* by electroporation, and no restoration of wild-type phenotypes such as motility was obtained. Restriction analyses of plasmids purified from colonies of *Xanthomonas albilineans* transformed with pPR017 showed that these bacteria contained rearranged versions of this plasmid lacking most if not all of the plasmid DNA insert. In contrast, more than 1000 colonies were obtained by transformation with the empty shuttle vector, pUFR047. It was therefore hypothesized that rearrangements of plasmid pPR017 after transfer into *Xanthomonas albilineans* were due to the presence of a restriction enzyme gene in the genome of *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1. Plasmid pPR017 was therefore methylated by transfer into *E. coli* DH5 α containing plasmid pPY0AAB27CH12 (including methyltransferase

Table 4. Pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* XaFL07-1 and *rpf* mutants in sugar cane cultivar CP80-1743 2 months after inoculation

The experiment was set up in a greenhouse in Gainesville (University of Florida) using a randomized complete block design with eight replications of one plant each. Sugar cane cultivar CP80-1743 was inoculated with each strain at 10^8 c.f.u. ml⁻¹. Control plants inoculated with distilled water were symptomless and free of the pathogen, and data for these plants are not included in variance analysis except for stalk size.

Strain	Pathogenicity parameter*				
	Disease severity (DS)	Extent of entire stalk colonization (ESC)	Extent of lower stalk colonization (ESC-lo)†	Extent of upper stalk colonization (ESC-up)‡	Stalk size (internodes 0–7) (cm)
XaFL07-1A	5.2 (1.21) ^{ab}	76 (1.07) ^c	39 (0.67) ^c	94 (1.40) ^{ab}	21 ^a
XaFL07-1B	5.3 (1.23) ^{ab}	79 (1.09) ^c	42 (0.70) ^c	97 (1.45) ^{ab}	25 ^a
$\Delta rpfF$ M15	4.1 (0.97) ^c	66 (0.95) ^c	28 (0.51) ^c	85 (1.18) ^c	25 ^a
$\Delta rpfG$ M6	5.6 (1.29) ^a	96 (1.45) ^{ab}	88 (1.36) ^a	100 (1.57) ^a	19 ^a
$\Delta rpfC$ M29	5.3 (1.23) ^{ab}	99 (1.50) ^a	96 (1.45) ^a	100 (1.57) ^a	25 ^a
$\Delta rpfGC$ M9	4.4 (1.03) ^c	94 (1.34) ^{ab}	88 (1.29) ^a	97 (1.44) ^{ab}	25 ^a
$\Delta rpfGCF$ M15	4.3 (1.01) ^c	90 (1.28) ^b	76 (1.12) ^{ab}	97 (1.45) ^{ab}	24 ^a
$\Delta rpfGCF$ M17	4.5 (1.05) ^c	91 (1.30) ^b	77 (1.12) ^{ab}	98 (1.46) ^{ab}	26 ^a
Water (control)	–	–	–	–	43 ^b

*DS and ESC values are on a 0–6 and 0–100 scale, respectively. Variance analysis of DS and ESC data was performed after arcsin square root transformation of data expressed as proportions (DS/6 and ESC/100). Means in parentheses are arcsin square root transformed data expressed as proportions (DS/6 and ESC/100). In each column, transformed DS and ESC values followed by the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Student–Newman–Keuls (SNK) test. Variance analysis of stalk size was performed without transformation of data and values followed by the same letter are not significantly different according to the t -test ($P<0.001$).

†Stalk internodes I_{–5} to I_{–1}.

‡Stalk internodes I₀ to I₊₉.

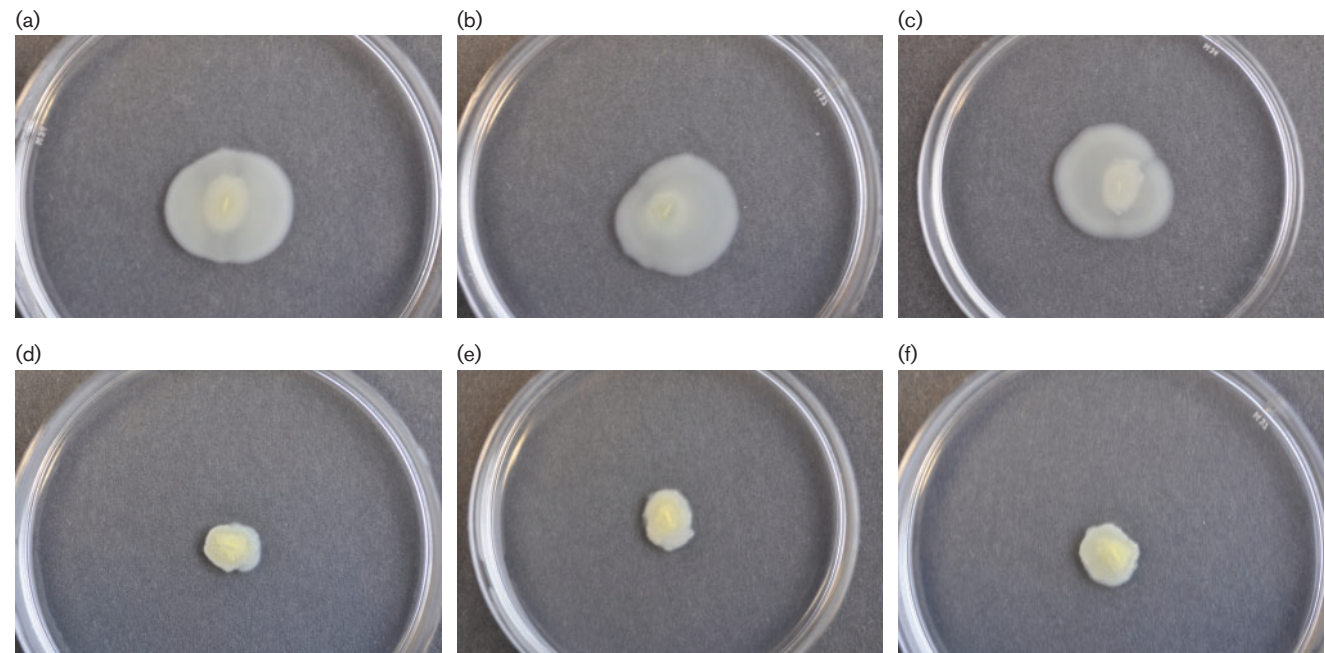


Fig. 3. Swimming motility of *Xanthomonas albilineans* in modified Wilbrink's 0.25% agar medium. (a) Wild-type XaFL07-1 (WT), (b) mutant $\Delta rpfC$ M29 (DSF sensor deficient), (c) mutant $\Delta rpfG$ M6 (DSF regulator deficient), (d) mutant $\Delta rpfGC$ M9 (deficient in RpfGC DSF transduction system), (e) mutant $\Delta rpfGCF$ M15 (deficient in DSF synthase and RpfGC DSF transduction system) and (f) mutant $\Delta rpfGCF$ M17 (deficient in DSF synthase and RpfGC DSF transduction system). Pictures were taken 12 days after stab inoculation of the medium.

XALc_2634), creating pPR017Met (Table 1), and then used to complement the *rpf* mutants.

Transfer of plasmid pPR017Met into $\Delta rpfGCF$ M17 resulted in growth of more than 1000 colonies after inoculation of the selective medium with 50 μ l of electroporated cells. Transfer of pPR017Met into $\Delta rpfGC$ M9 yielded about 10 times fewer colonies (>100). In repeated trials, transfer of plasmid pPR017Met into $\Delta rpfG$ M6 and $\Delta rpfC$ M29 produced 0–10 colonies whereas transfer of empty vector pUFR047 resulted in growth of more than 1000 colonies of these two mutants. These results indicated that plasmid pPR017Met was not stable in $\Delta rpfG$ M6 and $\Delta rpfC$ M29, and these transformed strains were therefore not further investigated.

After transformation with plasmid pPR017Met, swimming motility of $\Delta rpfGC$ M9 and $\Delta rpfGCF$ M17 was restored and even increased when compared with swimming motility of wild-type strain XaFL07-1 carrying pUFR047: complemented mutants showed increased swimming capacity as shown by the larger swimming haloes when compared with the corresponding strains containing empty vector pUFR047 (mean of 10 replications: 57 mm versus 17 mm and 84 mm versus 17 mm for mutants $\Delta rpfGC$ M9 and $\Delta rpfGCF$ M17, respectively) (see also Fig. 4).

Two months after inoculation of sugar cane stalks (nine plants per strain), no difference in stalk colonization was observed between $\Delta rpfGC$ M9 and this mutant complemented with plasmid pPR017Met. This plasmid was most probably not stable *in planta* without antibiotic (gentamicin) pressure. However, ESC of $\Delta rpfGCF$ M17 + pPR017Met was lower than ESC of $\Delta rpfGCF$ M17 + pUFR047 (46 versus 65 in a first experiment and 29 versus 67 in a second experiment), thus confirming negative regulation of spread of *Xanthomonas albilineans* in the stalk by the *rpf* gene cluster.

Concluding remarks

Colonization of the sugar cane stalk by *Xanthomonas albilineans* is an important feature in disease progress and resistance of sugar cane to leaf scald (Rott *et al.*, 1994, 1997). The Rpf/DSF cell–cell signalling system is required for full virulence of *Xanthomonas albilineans*, but it is not essential for production of disease symptoms and invasion of the sugar cane stalk by the pathogen. Nevertheless, this system may be critical at other phases of the disease cycle, such as in dissemination. In addition, leaf scald is known to be a latent disease and the sugar cane plant can be infected for weeks or months without exhibiting any disease symptoms (Rott & Davis, 2000). This latency period comes to an end for unknown reasons and cell–cell signalling and the action of the Rpf proteins might be involved in this phenomenon.

The role of DSF in *Xanthomonas albilineans* remains enigmatic. DSF did not appear to be essential for production of albicidin, a virulence factor for *Xanthomonas albilineans*, since the *rpfF* mutant was able to produce the characteristic

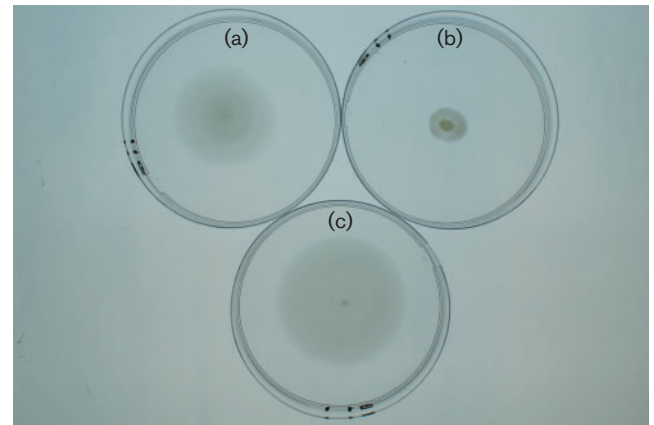


Fig. 4. Complementation of swimming motility of *Xanthomonas albilineans* in modified Wilbrink's 0.25% agar medium supplemented with 3 mg gentamicin l^{-1} . (a) WT pUFR047, i.e. wild-type strain XaFL07-1 containing empty shuttle vector pUFR047. (b) $\Delta rpfGC$ M9 pUFR047, i.e. mutant $\Delta rpfGC$ M9 (deficient in RpfGC DSF transduction system) containing empty shuttle vector pUFR047. (c) $\Delta rpfGC$ M9 pPR017Met, i.e. mutant $\Delta rpfGC$ M9 containing plasmid pPR017Met (*rpfBFCG* gene cluster). The picture was taken 7 days after stab inoculation of the medium.

pencil-line symptom that is attributed to this toxin (Birch, 2001). The *rpfF* mutant also affected growth of sugar cane stalks like the wild-type strain of *Xanthomonas albilineans*. DSF might be essential for interactions with another host of the pathogen. *Xanthomonas albilineans* is transmitted by aerial means, but no insect vector has been identified so far (Daugrois *et al.*, 2003, 2012). However, this bacterial species possesses an animal-pathogen-associated T3SS of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) injectisome family, suggesting that this pathogen interacts with an insect vector (Marguerettaz *et al.*, 2011). Therefore, as in *Xylella fastidiosa* (Newman *et al.*, 2004), DSF may play a role in interactions of *Xanthomonas albilineans* with an unknown insect vector.

An emerging theme from studies of the Rpf/DSF system in different xanthomonads is that although the elements of the system (RpfF, RpfC and RpfG) are highly conserved, their actions in different organisms show considerable diversification to fit specific needs for colonization of different hosts or niches (Chatterjee *et al.*, 2008a, b; Dow, 2008). In addition, it is becoming apparent that the Rpf/DSF signalling system has additional complexities that remain poorly understood. For example, protein–protein interactions between RpfC and RpfF may act to regulate DSF signal synthesis and RpfG is known to participate in divergent signalling cascades (Dow, 2008; He & Zhang, 2008; Ryan & Dow, 2011). The analysis that we present here for *Xanthomonas albilineans* indicates even further diversity of action of these regulatory elements. The lack of DSF in the *rpfF* mutant and overproduction of DSF in

the *rpfC* mutant of *Xanthomonas albilineans* are consistent with findings in a number of other *Xanthomonas* species and in *Xylella fastidiosa* (Barber *et al.*, 1997; Chatterjee *et al.*, 2008c; Dow, 2008; Newman *et al.*, 2004; Siciliano *et al.*, 2006). However, mutation of *rpfG* in *Xanthomonas albilineans* also led to an overproduction of DSF, which is not seen in other *Xanthomonas* species (He *et al.*, 2010; Slater *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2010). Secondly, the *rpfF* (DSF-deficient) mutant of *Xanthomonas albilineans* was only slightly affected in its capacity to colonize the host plant and to cause disease symptoms, in contrast to other species of *Xanthomonas* lacking DSF, which are generally severely affected in their capacity to cause symptoms (Dow, 2008; Siciliano *et al.*, 2006; Thowthampitak *et al.*, 2008). Thirdly, mutations in *rpfG* and *rpfC* of *Xanthomonas albilineans* had no effect on severity of disease symptoms but led to an enhanced ability to colonize sugar cane plants. These observations contrast with the effect of mutations of *rpfG* and *rpfC* in other *Xanthomonas* species and *Xylella fastidiosa*, which generally result in reduction of virulence and movement of the pathogen in planta (Chatterjee *et al.*, 2008a; Dow *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2010). These *Xanthomonas albilineans* strains also overproduced DSF but this did not appear to be involved in this increased spread of the pathogen in the sugar cane stalk since the $\Delta rpfGCF$ mutant, which cannot make DSF, also showed increased capacity for stalk invasion. Interestingly, increased stalk invasion by the *RpfC* and *RpfG* mutants was only seen in the lower part of the stalk where bacteria move against the transpiration stream.

Based on these results, the *RpfCG* two-component system appears to be more critical for colonization of the lower stalk by *Xanthomonas albilineans* than DSF biosynthesis. This suggests that the *RpfCG* system can respond to signals other than DSF; such signals could conceivably be of host plant or pathogen origin. Mutation of *rpfG* and *rpfC* either singly or in combination affected the degree of colonization to the same extent (Table 4). In contrast, effects on swimming motility and DS were only seen in the double mutant (Tables 3 and 4). This indicates that *RpfC* and *RpfG* can have regulatory actions that are independent of each other, as has been suggested previously [reviewed by Dow (2008)]. Although we have examined swimming motility in *Xanthomonas albilineans*, work on *Xylella fastidiosa* has shown that this pathogen colonizes the host xylem using type IV pili and twitching motility (Li *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2008a). It would now be of interest to examine the role of type IV pili, which are encoded by the *Xanthomonas albilineans* genome, on the ability to invade the sugar cane xylem.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jim Shine [Sugar Cane Growers Cooperative (SCGC), Belle Glade, FL] and Jack Comstock (USDA, Canal Point, FL) for supplying healthy sugar cane planting material and sugar cane infected with

Xanthomonas albilineans XaFL07-1. We also thank Monique Royer [Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Montpellier, France] for fruitful discussions and suggestions, and Marie-Josée Darroussat (CIRAD, Montpellier, France), Gary Marlow and Patricia Rayside (University of Florida, FL) for excellent technical assistance. P. R. was supported by a Marie Curie Outgoing International Fellowship from the European Commission.

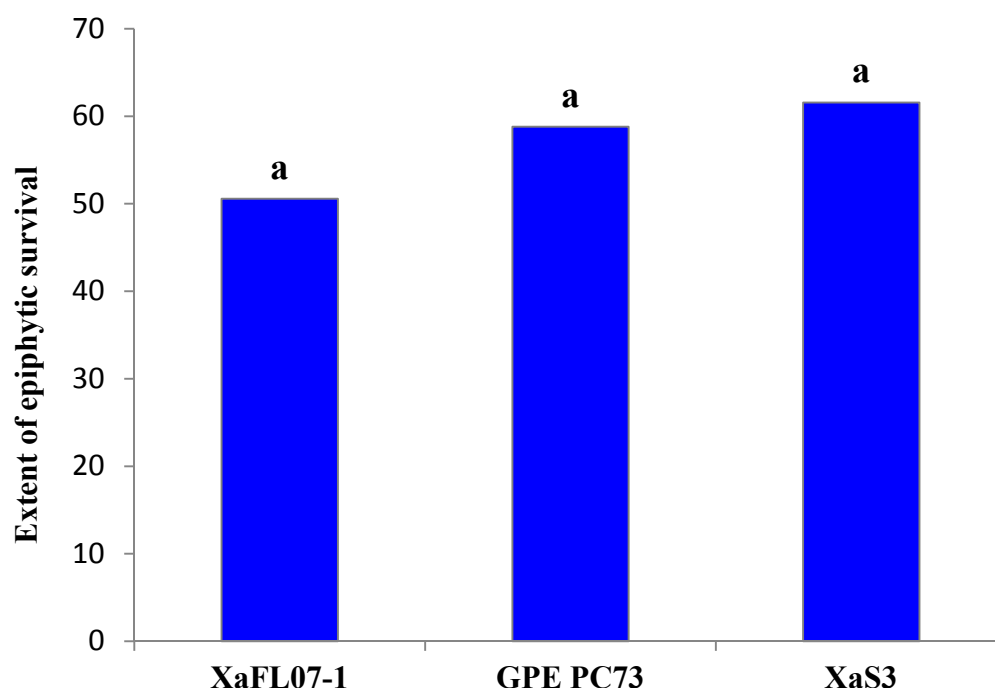
REFERENCES

- Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J. G., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P. & Daniels, M. J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol* **24**, 555–566.
- Birch, R. G. (2001). *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol Plant Pathol* **2**, 1–11.
- Castañeda, A., Reddy, J. D., El-Yacoubi, B. & Gabriel, D. W. (2005). Mutagenesis of all eight *avr* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one *avr* gene affected race specificity. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1306–1317.
- Champoiseau, P., Daugrois, J.-H., Girard, J.-C., Royer, M. & Rott, P. C. (2006). Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* **96**, 33–45.
- Chatterjee, S., Almeida, R. P. P. & Lindow, S. E. (2008a). Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu Rev Phytopathol* **46**, 243–271.
- Chatterjee, S., Newman, K. L. & Lindow, S. E. (2008b). Cell-to-cell signaling in *Xylella fastidiosa* suppresses movement and xylem vessel colonization in grape. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1309–1315.
- Chatterjee, S., Wistrom, C. & Lindow, S. E. (2008c). A cell–cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2670–2675.
- Chatterjee, S., Killiny, N., Almeida, R. P. P. & Lindow, S. E. (2010). Role of cyclic di-GMP in *Xylella fastidiosa* biofilm formation, plant virulence, and insect transmission. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1356–1363.
- Danhorn, T. & Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**, 401–422.
- Daugrois, J.-H., Dumont, V., Champoiseau, P., Costet, L., Boisne-Noc, R. & Rott, P. (2003). Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. *Eur J Plant Pathol* **109**, 445–458.
- Daugrois, J.-H., Boisne-Noc, R., Champoiseau, P. & Rott, P. (2012). The revisited infection cycle of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. *Func Plant Sci Biotech* **6** (Special issue 2), 91–97.
- Davis, M. J., Rott, P., Baudin, P. & Dean, J. L. (1994). Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis* **78**, 78–82.
- De Feyter, R. & Gabriel, D. W. (1991). Use of cloned DNA methylase genes to increase the frequency of transfer of foreign genes into *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *J Bacteriol* **173**, 6421–6427.
- De Feyter, R., Yang, Y. & Gabriel, D. W. (1993). Gene-for-gene interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* *avr* genes. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 225–237.

- Dow, M. (2008). Diversification of the function of cell-to-cell signaling in regulation of virulence within plant pathogenic xanthomonads. *Sci Signal* 1, pe23.
- Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.-Q., Feng, J.-X. & Tang, J.-L. (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10995–11000.
- Fouhy, Y., Scanlon, K., Schouest, K., Spillane, C., Crossman, L., Avison, M. B., Ryan, R. P. & Dow, J. M. (2007). Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* 189, 4964–4968.
- Geier, G. E. & Modrich, P. (1979). Recognition sequence of the *dam* methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of *DpnI* endonuclease. *J Biol Chem* 254, 1408–1413.
- Guo, Y., Zhang, Y., Li, J.-L. & Wang, N. (2012). Diffusible signal factor-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact* 25, 165–179.
- He, Y.-W. & Zhang, L.-H. (2008). Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev* 32, 842–857.
- He, Y.-W., Xu, M., Lin, K., Ng, Y. J., Wen, C.-M., Wang, L.-H., Liu, Z.-D., Zhang, H.-B., Dong, Y.-H. & other authors (2006). Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol Microbiol* 59, 610–622.
- He, Y.-W., Wu, J., Cha, J. S. & Zhang, L.-H. (2010). Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production. *BMC Microbiol* 10, 187.
- Klett, P. & Rott, P. (1994). Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. *J Phytopathol* 142, 283–291.
- Li, Y., Hao, G., Galvani, C. D., Meng, Y., De La Fuente, L., Hoch, H. C. & Burr, T. J. (2007). Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology* 153, 719–726.
- Marguerettaz, M., Pieretti, I., Gayral, P., Puig, J., Brin, C., Cociancich, S., Poussier, S., Rott, P. & Royer, M. (2011). Genomic and evolutionary features of the SPI-1 type III secretion system that is present in *Xanthomonas albilineans* but is not essential for xylem colonization and symptom development of sugarcane leaf scald. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 246–259.
- Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H. & Lindow, S. E. (2004). Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1737–1742.
- Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J. & other authors (2009). The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics* 10, 616.
- Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.-A. & other authors (2012). Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC Genomics* 13, 658.
- Ricaud, C. & Ryan, C. C. (1989). Leaf scald. In *Diseases of Sugarcane. Major Diseases*, pp. 39–58. Edited by C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. Gillaspie, Jr & C. G. Hughes. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers.
- Rott, P. & Davis, M. J. (2000). Leaf scald. In *A Guide to Sugarcane Diseases*, pp. 38–44. Edited by P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft & A. S. Saumtally. Montpellier, France: La Librairie du Cirad.
- Rott, P., Abel, M., Soupa, D., Feldmann, P. & Letourmy, P. (1994). Population dynamics of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane plants as determined with an antibiotic-resistant mutant. *Plant Dis* 78, 241–247.
- Rott, P., Mohamed, I. S., Klett, P., Soupa, D., de Saint-Albin, A., Feldmann, P. & Letourmy, P. (1997). Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. *Phytopathology* 87, 1202–1213.
- Rott, P., Fleites, L., Marlow, G., Royer, M. & Gabriel, D. W. (2011). Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 594–605.
- Ryan, R. P. & Dow, J. M. (2011). Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends Microbiol* 19, 145–152.
- Ryan, R. P., McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C. S., Armitage, J. P. & Dow, J. M. (2010). Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5989–5994.
- Ryan, R. P., McCarthy, Y., Kiely, P. A., O'Connor, R., Farah, C. S., Armitage, J. P. & Dow, J. M. (2012). Dynamic complex formation between HD-GYP, GGDEF and PilZ domain proteins regulates motility in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 86, 557–567.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Siciliano, F., Torres, P., Sendin, L., Bermejo, C., Filippone, P., Vellice, G., Ramallo, J., Castagnaro, A., Vojnov, A. & Marano, M. R. (2006). Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* pathogenesis in *Citrus limon*. *Electron J Biotechnol* 9, 199–204.
- Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C. E., Daniels, M. J. & Dow, J. M. (2000). A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 38, 986–1003.
- Sun, L., Wu, M., Chen, H. & He, C. (2010). Diffusible signal factor production and virulence expression in $\Delta rpfX_{xoo}$, $\Delta rpfC_{xoo}$ and $\Delta rpfG_{xoo}$, the gene deletion mutants of DSF/Rpf signaling proteins of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Acta Microbiol Sin* 50, 717–723.
- Tang, J. L., Liu, Y. N., Barber, C. E., Dow, J. M., Wootton, J. C. & Daniels, M. J. (1991). Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet* 226, 409–417.
- Thowthampitak, J., Shaffer, B. T., Prathuangwong, S. & Loper, J. E. (2008). Role of *rpfF* in virulence and exoenzyme production of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, the causal agent of bacterial pustule of soybean. *Phytopathology* 98, 1252–1260.
- Torres, P. S., Malamud, F., Rigano, L. A., Russo, D. M., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J. M. & Vojnov, A. A. (2007). Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environ Microbiol* 9, 2101–2109.
- Wang, L.-H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y.-H., He, C., Wang, S. X., Weng, L.-X., Xu, J.-L. & other authors (2004). A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol* 51, 903–912.
- Wang, N., Li, J.-L. & Lindow, S. E. (2012). RpfF-dependent regulon of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 102, 1045–1053.

Edited by: P. Rodríguez-Palenzuela

Annexe 4: Extent of epiphytic survival of wild-type strains XaFL07-1, GPE PC73 of *Xanthomonas albilineans* and the strain XaS3.



Extent of epiphytic survival of wild-type strains XaFL07-1, GPE PC73 of *Xanthomonas albilineans* and the strain XaS3. Data are the means of 12 plantlets (results of two independent experiments) and 2-3 leaves per plantlet, two weeks after immersion of leaves in a suspension of *X. albilineans* (1×10^7 CFU/ml). Bars with the same letter are not significantly different according to Tukey's test ($P < 0.05$).

These results were obtained as described in Mensi *et al.*, 2013. Surface polysaccharides and quorum-sensing are involved in survival of *Xanthomonas albilineans* on sugarcane leaves.

Localisation *in planta* de *Xanthomonas albilineans* et identification de déterminants moléculaires impliqués dans la colonisation épiphyte de sa plante hôte, la canne à sucre

Résumé

Xanthomonas albilineans est l'agent causal de l'échaudure des feuilles, une des principales maladies bactériennes de la canne à sucre dont l'impact peut être très important lorsque des variétés sensibles sont infectées au champ. Les mécanismes qui régissent les interactions entre cet agent pathogène et la canne à sucre sont encore très peu connus. Les objectifs de ce travail étaient (i) d'identifier des déterminants moléculaires impliqués dans la survie épiphyte de *X. albilineans* et (ii) de préciser la localisation de la bactérie dans les tissus de la canne à sucre. Parmi les facteurs étudiés, les polysaccharides de surface et une protéine de la membrane externe (XaOmpA1) de *X. albilineans* s'avèrent indispensables pour la survie épiphyte de cet agent pathogène. En revanche, la molécule signal diffusible DSF et les métabolites secondaires codés par les gènes NRPS (« Non Ribosomal Peptide Synthetases ») ne sont pas requis pour l'installation de la bactérie en surface des feuilles, au moins en l'absence d'autres microorganismes compétiteurs. Toutefois, la colonisation optimale de la phyllosphère de la canne à sucre nécessite la présence d'un système DSF/RpfGC intact. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons vérifié la localisation *in planta* de *X. albilineans* par microscopie confocale, immunocytochimie, et microscopie électronique à transmission. Les observations microscopiques réalisées ont permis de montrer que *X. albilineans* n'est pas limitée au xylème de la canne à sucre, comme on le considérait jusqu'à présent. Bien au contraire, cette bactérie est capable de quitter le système vasculaire de sa plante hôte et de pénétrer dans d'autres types cellulaires, notamment les cellules du parenchyme non vasculaire. Il s'agit là, à notre connaissance, d'un nouveau mécanisme de colonisation d'une plante par une bactérie phytopathogène qui reste à décrypter.

Mots clés: *Xanthomonas albilineans*, survie épiphyte, localisation, parenchyme non vasculaire.

***In planta* localization of *Xanthomonas albilineans* and identification of molecular factors involved in epiphytic colonization of its host plant, the sugarcane**

Abstract

Xanthomonas albilineans is the causal agent of leaf scald, a lethal disease of sugarcane that can significantly impact infected susceptible varieties in the field. The mechanisms that govern the interactions between this bacterial pathogen and its host plant are not well known. The objectives of this study were (i) to identify molecular factors involved in epiphytic survival of *X. albilineans* and (ii) to verify the localization of *X. albilineans* in sugarcane tissues. Among the studied factors, surface polysaccharides and an outer-membrane protein (XaOmpA1) of *X. albilineans* were crucial for epiphytic survival of this pathogen. Secondary metabolites synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and the diffusible signal factor DSF were not critical for survival of *X. albilineans* on the sugarcane leaf surface, at least in absence of competing microorganisms. However, an intact DSF/RpfGC system was necessary for optimal colonization of the phyllosphere. In the second part of this study, we verified *in planta* localization of *X. albilineans* by confocal microscopy, immunochemistry and transmission electron microscopy. Microscopic observations allowed us to show that *X. albilineans* is not a xylem limited bacterium as it was believed until now. This pathogen is able to invade numerous cellular types including vascular and non-vascular parenchyma cells. To our knowledge, this is a novel invasion strategy of a plant pathogenic bacterium that has not previously been described, and that remains to be deciphered.

Key words: *Xanthomonas albilineans*, epiphytic survival, localization, non-vascular plant tissue.